

**Influência da sobrecarga aguda de ferro no eixo
hipotálamo-hipófise-gonadal e na função
cardiovascular de ratas**

Emilly Martinelli Rossi

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Junho de 2015

Influência da sobrecarga aguda de ferro no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e na função cardiovascular de ratas

Emilly Martinelli Rossi

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 12/06/2015 por:

Prof^o. Dr^o. Jones Bernades Graceli

Orientador, UFES

Prof^o. Dr^o. Leonardo dos Santos,
Co-orientador, UFES

Prof^a. Dr^a Ivanita Stefanon, UFES

Membro interno

Prof^o. Dr^o Leandro Alves Miranda, ICB

Membro externo

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 2015

Rossi, Emilly Martinelli 1987

Influência sobrecarga aguda de ferro no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e na função cardiovascular de ratas. [Vitória] 2015

73p, 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2015)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Profº. Drº. Jones Bernades Graceli

1. Sobrecarga de Ferro
2. Disfunção endócrina
3. Anormalidade eixo HPG
4. Estresse Oxidativo

Dedico esta dissertação à Maria Antoinete Rossi.
Mãe, devo tudo o que sou e tudo o que eu acredito a você.
Me guiou pelo caminho certo, mostrando-me os valores de
família, honestidade e humildade. Meu exemplo de pessoa,
e de profissional. Carrego comigo os princípios e valores
ensinados. Obrigada!

As minhas tias querida, Ivone e Sueli. Por todo carinho,
torcida e pelas orações recebidas. Obrigada!

Amo vocês!!

“Somos quem podemos ser

Sonhos que podemos ter”

Engenheiros do Hawaii

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente na minha vida e tornar essa conquista possível. Obrigada Senhor por realizar muitas graças em minha vida.

Aos anjos que apareceram na minha vida, quando tudo parecia estar perdido, Renata Ávila, Elis Morra, Dieli Nunes, Eduardo Merlo, Profº Jones e Profº Leonardo. Compartilho desta vitória de igual forma com cada um de vocês.

Aos meus orientadores, Jones e Leonardo. Obrigada pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança, os conselhos e ensinamentos que vão além da ciência. Vocês foram essenciais nessa etapa final. Peço desculpas se deixei a desejar. Obrigada de todo coração pelo que fizeram por mim!

À Renata e Elis, não tenho palavras para agradecer tudo o que você fizeram por mim. Obrigada pelo carinho, conselhos, ombro amigo e todos os momentos de “bobeira” no laboratório.

Ao Profº Drº Dalton, Profª Dra. Ivanita Stefanon e Profª Drª Alessandra, obrigada pela oportunidade e por terem me acolhido no LEMC. Agradeço os conhecimentos compartilhados durante os seminários e as críticas enriquecedoras durante a apresentação de nossos projetos.

Aos professores do PPGCF pelos conhecimentos compartilhados.

À Dieli e Karol Zuqui, obrigada meninas pelo apoio, pelas conversas e amizade. Agradeço pela parceria e por fazerem meus momentos de desespero momentos de diversão.

A grande família LEMC: Bruna, Bruna Marchezine, Camila, Carolina, Cindy, Cleidiane, David Chaves, David Freire, Edna, Emilia, Fabiana Simões, Gilson, Jonaina, João Vitor, Marito, Maylla, Patricia, Paula, Rodrigo, Rogério, Sabrina, Samya, Tatiane, Teresa, Thiago, Vinícius e Wena. Obrigada pelas conversas e

os dias de alegria. Cada um, ao seu modo, deixou sua marca pelo meu caminho.

A família do laboratório de Toxicologia: Eduardo, Gabriela, Julia e Priscila. Obrigada pela ajuda, convivência amigável, troca de conhecimentos e momentos de alegria.

Aos colegas de outros laboratórios, que juntos compartilhamos muitos momentos de preocupação e alegria no decorrer das disciplinas e nos esbarrões pelos corredores. Em especial, agradeço a Eweline e Girlândia. Meninas, vocês são uns amores!

Às minhas grandes amigas, Janaina e Lorena. Obrigada por tantas vezes compreenderem minha distância. Obrigada pelas palavras de conforto, pela diversão, pelo apoio nos momentos difíceis e, acima de tudo, por saber que posso sempre contar com vocês. Amo vocês!!

Às minhas amigas “Lufanéias”, por também compreenderem minha ausência. Obrigada pelo apoio de vocês em todos os momentos, pelas palavras motivadoras, momentos de diversão e descontração.

E um agradecimento especial à minha prima Priscila. Pri, você é meu exemplo de perseverança e profissional. Obrigada pelos conselhos, por fazer enxergar nos momentos de desespero e angústia, outras possibilidades, outros caminhos nos dias de dificuldade.

Me faltam palavras para agradecer a vocês: meu eterno, obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 FERRO.....	16
1.1.1 Cinética do Ferro.....	16
1.2 SOBRECARGA DE FERRO.....	19
1.2.1 Sobrecarga de Ferro primária e secundária.....	20
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	21
1.4 ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES.....	22
1.5 ALTERAÇÕES ENDÓCRINAS.....	23
1.5.1 Ciclo reprodutivo.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	28
3.1.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	28
3.2 DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL.....	29
3.3 DOSAGEM HORMONAL.....	30
3.4 RETIRADA E PESAGEM DOS ÓRGÃOS.....	31
3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	31
3.6 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO <i>IN SITU</i>	32
3.6.1 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE) em segmentos de aorta, nos tecidos ovariano e hipófise.....	32
3.7 MEDIDA DE PRODUÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NO PLASMA.....	33

3.8 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA.....	33
3.9 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	34
3.9.1 Western Blotting (Immunoblotting)	35
3.10 MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....	36
3. 11 EXPRESSÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	37
4 RESULTADOS	38
4.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO PLASMÁTICO E TECIDUAL.....	38
4.2 PESO DOS ÓRGÃOS E DOSAGEM HORMONAL.....	40
4.3 EFEITO DA SOBRECARGA DE FERRO NO EIXO HIPOTÁLAMO- HIPÓFISE.....	41
4.4 AVALIAÇÃO DA SOBRECARGA DE FERRO NOS OVÁRIOS.....	43
4.5 EFEITO DA SOBRECARGA DE FERRO NA MORFOLOGIA OVARIANA.....	45
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) COM SOBRECARGA DE FERRO NOS OVÁRIOS.....	47
4.7 AVALIAÇÃO DA SOBRECARGA DE FERRO NO ÚTERO.....	49
4.8 EFEITO DA SOBRECARGA DE FERRO NA MORFOMETRIA UTERINA.....	51
4.9 EFEITO DA SOBRECARGA AGUDA DE FERRO NOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO OVARIANOS E UTERINOS.....	53
4.10 EFEITO DA SOBRECARGA DE FERRO NO CORAÇÃO E PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) EM SEGMENTOS AÓRTICOS.....	54
4.11 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	56
5 DISCUSSÃO	59
6 REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS E LEGENDAS

Figura 1: Metabolismo do Ferro.....	17
Figura 2: Esfregaço vaginal das ratas.....	30
Figura 3: Avaliação do acúmulo de ferro no soro, baço, fígado e MDA plasmático.....	39
Figura 4: O efeito da sobrecarga de ferro nos pesos hipotálamo, hipófise, ovário e útero e níveis gonadotrofinas.....	40
Figura 5: Avaliação do acúmulo de ferro no eixo hipotálamo-hipófise e a produção de ânion superóxido na hipófise.....	42
Figura 6: Acúmulo de ferro no ovário avaliada pela coloração da Azul da Prússia.....	44
Figura 7: Sobrecarga de ferro aguda no desenvolvimento folicular ovariano...	46
Figura 8: Sobrecarga aguda de ferro na produção de ânion superóxido ovariano.....	48
Figura 9: Avaliação do acúmulo de ferro no útero.....	50
Figura 10: Efeitos da sobrecarga aguda de ferro na morfometria uterina.....	52
Figura 11: Análise western blot para proteínas ER α e ER β	53
Figura 12. Sobrecarga aguda de ferro na produção de ânion superóxido em segmentos aórticos.....	54
Figura 13: Avaliação de parâmetros pressóricos arteriais e FC.....	56
Figura 14: Avaliação de parâmetros hemodinâmicos ventriculares esquerdo.	57
Figura 15: Avaliação de parâmetros hemodinâmicos ventriculares direito.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATÖES

[Fe] Concentração de ferro

•OH: Radical hidroxila

% : Porcentagem

An: Folículo Antral

ANOVA: Análise de Variância

At: Folículo Atr sico

CEUA: Comissão de  tica em Uso de Animais

CL: Corpo Lúteo

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DHE: Dihidroet dio

DMT1: Transportador de metal divalente 1

DNA:  cido desoxirribonucleico

dP/dt (-): Derivada temporal de pressão negativa

dP/dt (+): Derivada temporal de pressão positiva

END: endométrio uterino

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies Reativas de Oxig nio

FC: Frequência Cardíaca

Fe: Ferro

Fe²⁺: Ferro ferroso

Fe³⁺: Ferro férrico

FSH: Hormônio Folículo-estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

H₂O:  gua

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HCP1: Proteína transportadora heme-1

HH: Hemocromatose hereditária

HFE: gene

HJV: Hemojuvelina

HPG: Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

i.p: via intraperitoneal

LH: Hormônio Luteinizante

MDA: Malondialdeído

MYO: miométrio

NADPH oxidase: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase

NaCl: Cloreto de sódio

NO: Óxido Nítrico

O₂⁻: Ânion superóxido

O₂: Oxigênio

OH⁻: radical hidroxila

PA: Pressão arterial

PAD: Pressão arterial diastólica

PAM: Pressão arterial média

PAS: Pressão arterial sistólica

PDfVD: Pressão diastólica final do ventrículo direito

PDfVE: Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PSVD: Pressão sistólica do ventrículo direito

PSVE: Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

ROS: Espécies reativas de oxigênio

TfR: Receptor da transferrina

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

VD: Ventrículo Direito

VE: Ventrículo esquerdo

RESUMO

Ferro é um mineral essencial e desempenha funções importantes na fisiologia de mamíferos. No entanto, a sobrecarga de ferro bem como o seu depósito nos tecidos têm levado a disfunções endócrinas. Estudos que avaliam os efeitos da sobrecarga de ferro aguda no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) são particularmente escassos. Este estudo avaliou a sobrecarga de ferro aguda sobre a função HPG, a produção de radicais livres e os efeitos nos parâmetros hemodinâmicos. Ratas Wistar foram tratadas com ferro dextrano (250, 500 e 1000 mg/Kg ip) e sua morfofisiologia reprodutiva foi avaliada por meio da análise histológica, foi mensurado a concentração de ferro por espectrofotometria de absorção atômica, estresse oxidativo na hipófise, ovário e segmentos aórticos pela técnica de DHE e a concentração plasmática de estrogênio nas ratas tratadas com ferro. O tratamento com sobrecarga de ferro desencadeou acúmulo nos tecidos, aumento na produção de ânion superóxido na hipófise, ovário e aorta, prejudicou no desenvolvimento folicular ovariano bem como redução da concentração plasmática de estrogênio e alterou a PSVD nas ratas do grupo Fe 500. Ademais, estes dados fornecem evidência in vivo em que a sobrecarga de ferro aguda é tóxica para morfofisiologia do eixo HPG, que pode estar associado com riscos à função reprodutiva.

Palavras-chave: sobrecarga de ferro, disfunção endócrina, anormalidade eixo HPG, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Iron is an essential metal and plays critical role in physiologic process of mammals. However, iron overload as well their tissue deposit have been shown to be endocrine disrupters. However, studies evaluating the effects of acute iron overload on hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis health are particularly sparse. This study evaluated the acute iron overload on the HPG function, the production of free radicals and the effects on hemodynamic parameters. Females rats were treated with iron dextran (250, 500 e 1000 mg/Kg ip) and reproductive morphophysiological was assessed by histological analysis, was measured the concentration of iron by atomic spectrophotometry, oxidative stress in the pituitary, ovary and aortic segments by DHE, estrogen levels in female rats treated with iron. Treatment with iron overload triggered accumulation in tissues , increase of superoxide anion production in the pituitary , ovary and aorta, abnormal ovarian follicular development and reduction of estrogen levels and changed the PSVD observed in the group Fe 500. Together, these data provide in vivo evidence that acute iron overload are toxic for HPG morphophysiology, which may be associated with risks to reproductive function.

Keywords: iron overload, endocrine disruption, HPG axis abnormalities; oxidative stress

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ferro

O ferro é um metal essencial para homeostase celular e participa de diversos mecanismos fisiológicos: síntese de hemoglobina, ligação e transporte de oxigênio através da hemoglobina e mioglobina, reações de oxidação-redução, proliferação celular, síntese de DNA e ação como cofator enzimático na cadeia respiratória mitocondrial. Pode se associar a proteínas, como NADPH oxidase e óxido nítrico síntase, participando na catálise de reações metabólicas e/ou imunológicas (Dunn *et al*, 2006; Ganz, 2013; Gudjoncik *et al*, 2014).

A obtenção do ferro é feita de duas formas: absorção pelo epitélio duodenal e/ou reciclagem do ferro contido nas hemoglobinas das hemácias (Dunn *et al*, 2006). Uma das fontes de ferro alimentares são carnes vermelhas e derivados animais, que se encontra na forma heme (mais facilmente absorvida). Já em vegetais folhosos e grãos, o tipo não hêmico, que está principalmente na forma férrica (Fe^{3+}) (Grotto, 2010). No epitélio duodenal cerca de 10% do ferro encontra-se complexado com proteínas (heme) e os outros 90% encontram-se na forma não-heme. Quando na forma iônica apresenta-se como íon férrico (Fe^{3+}). Essa forma não pode ser absorvida pelos enterócitos e necessita ser reduzida para a forma ferrosa (Fe^{2+}) pela enzima ferrireductase, presente na membrana dos próprios enterócitos. Quando reduzido, o ferro é absorvido pelo enterócito pela ação do transportador de metal divalente (DMT-1) e associado à proteína ferritina.

1.1.1 Cinética do ferro

O ferro heme é absorvido pelo enterócito no epitélio duodenal, através da proteína transportadora heme-1 (HCP1) e transportador de metal divalente 1 (DMT1). Para a absorção da forma Fe^{3+} ocorre uma reação de redução, através da redutase férrica, para a forma ferrosa (Fe^{2+}). Após absorção, no meio intracelular certa quantidade de Fe^{2+} é convertida para Fe^{3+} e se liga à ferritina e o restante de Fe^{2+} se liga ao transportador basolateral, a ferroportina,

direcionando-se para o sangue para ser convertido em Fe^{3+} pela ação da ferroxidase hefaestina, se ligando posteriormente à transferrina. O ferro heme é absorvido através do HCP1, e no meio intracelular o ferro é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase, e segue o mesmo destino do restante do Fe^{2+} presente do enterócito. O organismo humano absorve cerca de 1–2 mg de ferro por dia em uma dieta normal contendo entre 13–18 mg de ferro (Dunn et al, 2006, Grotto, 2010; Siddique & Kowdley, 2012; Ganz, 2013,).

Além da absorção intestinal, a reciclagem do ferro pode ocorrer pela fagocitose e a degradação de hemácias senescentes são uma fonte importante de ferro para o organismo (25–30 mg por dia), quantidade que é suficiente para manter a hematopoese diária. Esse processo é realizado principalmente pelos macrófagos do baço e medula óssea e em menor proporção nas células de Kupffer no fígado, que ocasiona em liberação de ferro e bilirrubina. O ferro é pode então ser retido nas moléculas de ferritina no macrófago ou exportado pela ferroportina para circulação (Grotto, 2010).

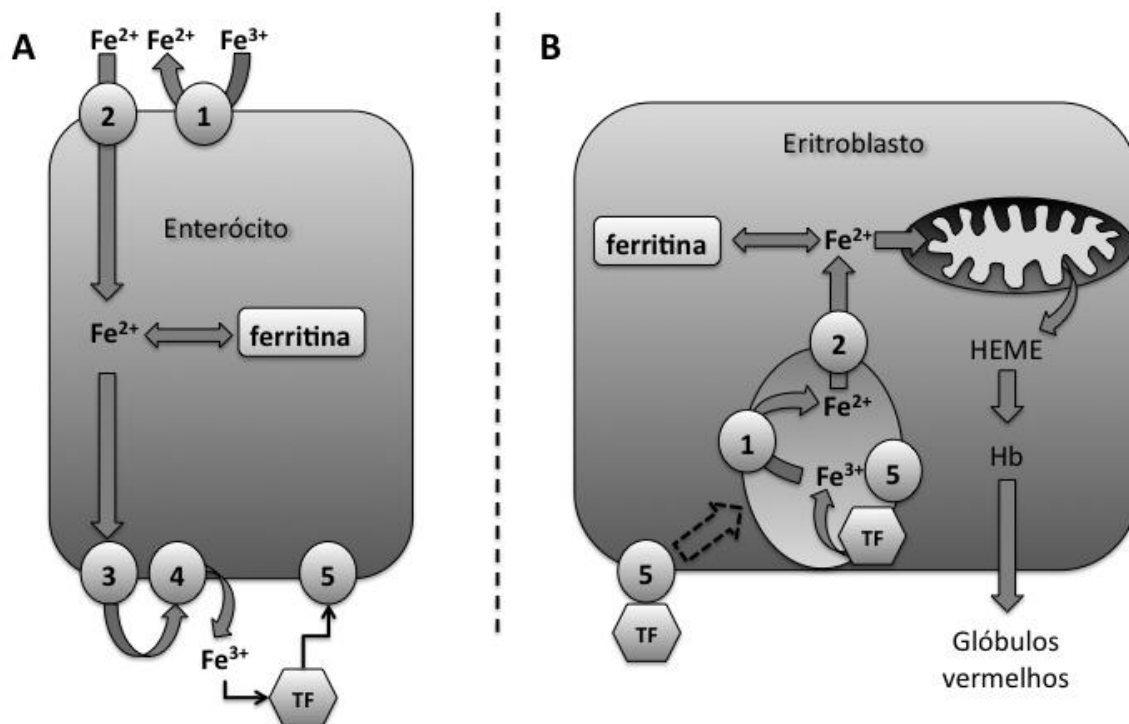


Figura 1: Metabolismo do Ferro. (A) Principais vias de absorção do ferro iônico de origem dietética nos enterócitos. 1- ferreredutase; 2 - DMT1; 3 - ferroportina; 4 - Hefastina; 5 - Receptor de transferrina; TF - Transferrina. (B) Principais vias de utilização do ferro pelos eritroblastos. Hb - hemoglobina. Modificado de Muñoz, 2009.

No meio extracelular o ferro ferroso é novamente oxidado pela enzima hefastina na membrana basolateral dos enterócitos, o que permite sua ligação com a transferrina, uma proteína plasmática sintetizada no fígado, retina, testículo e cérebro. (Muñoz *et al*, 2009; Grotto, 2010). A transferrina possui 2 sítios, e em pH neutro pode transportar até dois átomos de ferro, e além disso o solubiliza, atenua sua reatividade e facilita sua liberação para as células (Grotto, 2010). Atua como um quelante de ferro tornando-o indisponível na forma iônica e apenas as células que expressam o receptor de transferrina (proeritroblastos, células do sistema imunológico e hepatócitos) terão acesso ao ferro de origem dietética.

Em condições normais, a transferrina humana tem capacidade de transportar até 12 mg de ferro. Porém, esta capacidade raramente é utilizada, e em geral de 4-6 mg de ferro circulam ligados a transferrina, equivalente a aproximadamente 30-50 % de saturação pelo ferro. Quando complexado a transferrina, a internalização do ferro é iniciada pela interação desse complexo com receptor da transferrina (TfR) (Ponka *et al*, 1998; Dunn *et al*, 2006) que levará, após várias etapas, como a endocitose do complexo apoTf-TfR-HFE, com posterior liberação do ferro (Dunn *et al*, 2007; Grotto, 2010; Siddique & Kowdley, 2012). Além disso, alguns sistemas/órgãos podem captar o ferro também não ligado a transferrina, como o coração e o fígado (Liuzzi *et al*, 2006). Dessa forma, quando a capacidade de ligação a transferrina está totalmente saturada o ferro pode circular livremente pelo soro, intensificando seu depósito tecidual (Grotto, 2010). O ferro fica armazenado na forma de estoques de ferritina e hemossiderina, normalmente presentes nas células do baço, fígado e medula óssea (Grotto, 2010).

O ferro é eliminado do organismo pelas secreções corpóreas, descamação das células intestinais e epidérmicas ou sangramento menstrual. No entanto, em situações de sobrecarga, como o organismo não possui mecanismos específicos que regulem sua eliminação, o equilíbrio do ferro corporal necessita de especial comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque (Grotto, 2010).

Desordens de origens primárias ou secundárias podem causar sobrecarga de ferro no organismo, ocasionando depósitos de ferritina e/ou

hemossiderina em vários tecidos (Siddique & Kowdley, 2012), incluindo fígado, baço, coração, artérias, cérebro e pulmão (Day *et al*, 2003; Jiang *et al*, 2007; Lou *et al*, 2009; Ma *et al*, 2012;), contribuindo para o desenvolvimento de lesões importantes nesses sítios.

O desequilíbrio das concentrações de ferro no organismo pode acarretar consequências fisiopatológicas. Por exemplo, a falta de ferro provoca a anemia, com prejuízo do transporte e oxigênio pelos eritrócitos, enquanto a sobrecarga deste elemento está associada à formação de radicais livres e peroxidação lípida, comprometendo a função de diversos órgãos e sistemas (Muñoz *et al*, 2009).

1.2 Sobrecarga de Ferro

A sobrecarga de ferro tem sido relacionada a muitas desordens morfo-funcionais em diversos órgãos, sendo o fígado, o principal órgão afetado pois é seu principal local de armazenamento. (Siddique & Kowdley, 2012; Santos *et al*, 2012a; Santos *et al*, 2012b).

O depósito contínuo de ferro no fígado desencadeia um processo inflamatório que provoca um enrijecimento que pode evoluir para cirrose ou câncer. No pâncreas, o processo inflamatório, causado por ferro em excesso, pode prejudicar a capacidade de se produzir insulina, levando a um quadro de diabetes. No coração, o efeito tóxico do ferro pode provocar arritmias e insuficiência cardíaca, mesmo em pessoas jovens (Ministério da Saúde, 2008).

Um sintoma recorrente de sobrecarga de ferro é a pigmentação marrom da pele, provocada pela melanina e deposição de ferro na camada basal da epiderme e em torno de glândulas sudoríparas, sendo mais pronunciada nas regiões onde a pele é exposta ao sol. (Siddique & Kowdley, 2012).

21.2.1 Sobrecarga de Ferro primária e secundária

A sobrecarga de ferro pode ser classificada em primária ou secundária. Na primária estão incluídas as alterações em genes de proteínas relacionadas à absorção de ferro, chamada hemocromatose hereditária. A sobrecarga de ferro está comumente associada a mutações nos genes que codificam proteínas envolvidas em sua homeostase como HFE, TfR, HJV, BMP6 e HAMP, caracterizando o desenvolvimento de diferentes formas de hemocromatoses (Siddique & Kowdley, 2012).

A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva, resultante de perda da regulação da entrada de ferro na circulação, levando ao acúmulo de ferro que deposita em diversos tecidos. A HH relacionada ao gene HFE (HH tipo 1) ocorre em aproximadamente 80% dos casos de HH. A proteína codificada pelo gene relacionado à hemocromatose (HFE) normalmente participa de vias inibitórias para a absorção e disponibilização de ferro, compete com a transferrina (proteína transportadora de ferro) na ligação com seu receptor (TfR1), regulando a passagem deste íon para o citoplasma das células do organismo (Edison *et al*, 2008; Santos *et al*, 2009), e ainda parece sinalizar para o estímulo da expressão de hepcidina em situações de ferro sérico elevado (Darshan & Anderson, 2009).

Dentre as HH não-HFE, destacam-se as tipo 2, 3 e 4. A HH tipo 2 é mais rara, causada tanto por mutações no gene para a hemojuvelina (tipo 2A) quanto para a hepcidina (tipo 2B). A HH tipo 3 é causada por mutações no gene codificador do receptor de transferrina 2, comprometendo assim como na HH tipo 1, o controle da expressão de hepcidina e a interação com transferrina na sinalização em elevações dos níveis de ferro. Já a HH tipo 4 é uma doença autossômica dominante, originada por mutações no gene codificador da ferroportina, o que compromete a saída de ferro de células com enterócitos e macrófagos (Cançado, 2010; Siddique & Kowdley, 2012)

A sobrecarga de ferro pode ocorrer, também devido às causas secundárias tais como: transfusões sanguíneas repetidas em decorrência de anemias hemolíticas (talassemias, esferocitose hereditária, anemia autoimune, entre outras), presença de doenças hematológicas (anemia sideroblástica,

síndrome mielodisplásica) e doenças hepáticas (hepatite C, esteatose hepática não-alcolica) (Saad et al, 2010; Siddique & Kowdley, 2012)

As principais desordens de origem secundária responsáveis por sobrecarga de ferro são as desordens hematológicas como: talassemia (maior e intermediária), anemias sideroblástica (adquiridas ou congênitas), anemias diseritropoiéticas (deficiência de piruvato kinase, anemia perniciosa crônica, esferocitose hereditária, anemia falciforme e síndrome mielodisplásica), etc. A talassemia é a causa mais comum de hematopoese ineficiente consequente sobrecarga de ferro secundária. Muitas dessas patologias demandam necessidade de múltiplas transfusões sanguíneas, o que pode agravar a sobrecarga de ferro (Gattermann, 2009; Siddique & Kowdley, 2012). Nesse aspecto, vale ressaltar que a transfusão sanguínea crônica é a principal causa de sobrecarga de ferro, independente da doença de base (Gattermann, 2009).

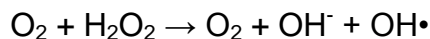
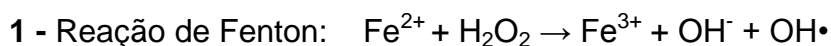
As transfusões sanguíneas ocorrem nesses pacientes a cada três vezes semana, mantendo um nível de hemoglobina entre 9 e 12 g/dl. Contudo, cada unidade transfundida (200 ml) contém 200 a 250 mg de ferro e organismo não tem mecanismos fisiológicos para remoção das reservas de ferro (Okonko *et al*, 2011). Desta forma, o acúmulo de ferro se dá por hemossiderose, resultando em disfunção multisistêmica envolvendo principalmente órgãos com mais altos níveis de receptor de transferrina, coração, fígado e sistema endócrino (Roussou *et al*, 2013). Particularmente, o coração é o órgão alvo letal na talassemia. As complicações, incluindo-se insuficiência cardíaca são responsáveis por 71% dos óbitos desses pacientes. No sistema endócrino, o ferro deposita no hipotálamo, hipófise, tireoide e gônadas em ambos sexos levando ao quadro de hipotireoidismo, hipogonadismo com atraso puberdade e baixa estatura (Cançado, 2010).

1.3 Estresse Oxidativo

Uma vez que não há uma via fisiológica para excreção do ferro do organismo, o mecanismo de perda ocorre principalmente por descamação do epitélio intestinal e nas mulheres pela menstruação. A ausência de uma via

eficaz para excreção é o principal fator responsável pela situação de sobrecarga. Com a sobrecarga de ferro a capacidade da transferrina sérica de se ligar ao ferro é excedida, causando o acúmulo de ferro não-ligado a transferrina no plasma (Siddique & Kowdley, 2012; Ganz, 2013). Essa forma livre do ferro tem forte tendência em mediar reações que levam a produção de espécies reativas de oxigênio e consequentemente causam estresse oxidativo com lesões e destruição celular (Shazia *et al*, 2012).

O ferro por ser um metal de transição, possui eletrons desemparelhados, o que lhe confere a capacidade de receber e doar eletrons, atuando como catalisador das reações redox que ocorrem nas células (Andrews, 2000; Ganz, 2013). O Fe^{2+} pode participar da reação de Fenton (reação 1) produzindo radical hidroxila. O superóxido participa da reação de Haber-Weiss (reação 2), que combina com a reação de Fenton na produção de radical hidroxila, e reduz o Fe^{3+} formando Fe^{2+} e oxigênio.



O ferro catalisa a conversão do superóxido e peróxido de hidrogênio em radical hidroxila, que promove o estresse oxidativo resultando em apoptose e morte celular. (Shazia *et al*, 2012)

1.4 Alterações cardiovasculares

Estudos clínicos e de modelo animal tem demonstrado que o aumento do estresse oxidativo com a sobrecarga de ferro ocasiona prejuízos no sistema cardiovascular. (Oudit *et al*, 2003 e 2004; Lou *et al*, 2009; Pardo Andreu *et al*, 2009; Murphy *et al*, 2010; Kramer *et al*, 2012; Cheng & Lian, 2013).

Estudos demonstraram o aumento de estresse oxidativo no organismo de ratos tratados com ferro cronicamente (Lou *et al*, 2009; Kramer *et al*, 2012)

e agudamente (Lucessoli *et al*, 1999; Pardo Andreu *et al*, 2009; Lou *et al*, 2009), o que leva a danos importantes no sistema cardiovascular. Estresse oxidativo elevado também foi identificado em camundongos tratados com ferro cronicamente e subagudamente (Day *et al*, 2003; Oudit *et al*, 2003; Oudit *et al*, 2004) e em humanos, sobrecarga de ferro decorrentes de origem primária e secundária (Gaenger *et al*, 2002, Kukongviriyapan *et al*, 2008).

Modelos experimentais descrevem que a sobrecarga de ferro no organismo animal igualmente induz toxicidade em vários sistemas, incluindo disfunção cardíaca com altas taxas de mortalidade, basicamente por aumento na geração de radicais livres e diminuição das vias antioxidantes endógenas (Bartfay & Bartfay, 2000; Day *et al*, 2003; Oudit *et al*, 2003). Em estudo experimental de sobrecarga de ferro em ratos, Kramer *et al* (2012) verificaram diminuição do trabalho cardíaco e do débito cardíaco e aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Em camundongos, são descritos aumento da mortalidade, bradicardia, hipotensão, disfunção sistólica e diastólica, aumento da fibrose miocárdica e estresse oxidativo (Oudit *et al*, 2003; 2004) e as alterações da espessura do septo interventricular e da parede posterior ventricular durante a diástole são correlacionadas com concentração de ferro tecidual, que por sua vez dependem das doses acumulativas de ferro (Moon *et al*, 2011).

1.5 Alterações Endócrinas

Disfunções no sistema endócrino também são comuns em pacientes e/ou modelos animais de sobrecarga de ferro, o que resulta em acúmulo no parênquima de órgãos como fígado, pâncreas e hipófise, acometendo suas funções (Siddique & Kowdley, 2012). Como no desenvolvimento de diabetes mellitus, devido à diminuição da secreção de insulina em consequência ao acúmulo de ferro nas células beta do pâncreas ou devido à resistência insulínica (Hramiak *et al*, 1997; Mendler *et al*, 1997). Além disso, hipogonadismo pode ocorrer devido a disfunção no hipotálamo, hipófise ou gônadas (Siminoski *et al*, 1990), podendo levar a prejuízos na liberação das gonadotropinas, bem como suas ações ovarianas (Edwards *et al*, 1983).

1.5.1 Ciclo reprodutivo

Em roedores, como as ratas, o ciclo estral ou ciclo reprodutivo regular tem duração média de quatro ou cinco dias (Freeman, 1988; Spornitz *et al*, 1999; Bianchi *et al*, 2001) e é caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro, com duração média de 12-18h, 25-30h, 24-30h e 28-50h, respectivamente (Freeman, 1988).

Assim como no ciclo menstrual em mulheres, as concentrações dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) em ratas começam a aumentar no início da fase folicular, ou pré-ovulatória, o proestro, que é identificado pela presença de aglomerados de células epiteliais nucleadas, e normalmente dura 1 dia. Embora o desenvolvimento folicular ocorra desde o início do proestro (Schwartz, 1964), a fase seguinte, o estro, é que corresponde à fase ovulatória onde a progesterona encontra-se em seu nível máximo. As células da vagina nessa fase apresentam-se rotineiramente cornificadas, com intensa descamação. A predominância de células cornificadas dura 1 dia de um ciclo de 4 dias, ou pode durar 2 dias consecutivos em um ciclo de 5 dias. Na fase seguinte, metaestro, a secreção de estradiol começa a aumentar, atingindo níveis máximos no proestro do ciclo seguinte, retornando à linha de base em estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o metaestro, e após o diestro os níveis de progesterona voltam a diminuir. Em seguida, o nível de progesterona aumenta para atingir o seu segundo pico no final do proestro. O termo metaestro é utilizado para descrever um período de transição, ou seja, corresponde à fase entre os ciclos, na qual não há ação máxima de apenas um hormônio, e assim as células vaginais se mostram diversificadas: uma combinação de leucócitos, células cornificadas e células epiteliais. Em seguida, no diestro, as células da vagina não apresentam descamação e há grande número de leucócitos no muco vaginal. Nessa fase, o estradiol começa a agir sobre o organismo, mesmo com níveis correspondentes à metade da taxa máxima. Em um segundo dia de diestro, no muco vaginal podem ser observadas células epiteliais nucleadas aglomeradas, que anunciam o proestro do dia seguinte, fase em que a ação máxima do estradiol ocorre (Schwartz, 1964; Sportnitz *et al*, 1999).

Os neurônios hipotalâmicos, produzem o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que após alcançar a adeno-hipófise, estimula a produção das gonadotrofinas, LH e FSH. Nas mulheres, estimulam o crescimento dos folículos ovarianos, a produção de estrogênio, progesterona, e inibina, que atuam em seus órgãos alvo e na modulação ao longo do eixo hipotálamo-hipófise. Ademais o LH e FSH induzem a ovulação e iniciam a formação do corpo lúteo (Filicori *et al*, 1986; Magiakou *et al*, 1997). O ciclo reprodutivo é dividido em fase folicular, ovulatória e lútea.

A fase folicular se inicia logo após a fase lútea tardia do ciclo reprodutivo anterior, com o início do crescimento folicular e um aumento dos níveis séricos de FSH. Um ou dois dias depois, os níveis de LH tendem a subir, enquanto a secreção ovariana de estradiol se inicia. Entre o sétimo e o oitavo dia anterior ao pico de LH pré-ovulatório ocorre um acentuado aumento na secreção de estradiol ovariano. A elevação do nível sérico de estradiol é acompanhada por uma diminuição de FSH. Ocorre em paralelo um pequeno aumento no nível sérico de progesterona, e em seguida observa-se o rápido aumento no nível de LH, caracterizando o pico de LH ovulatório, momento final da maturação do folículo de Graaf com ruptura entre a 16^a e 24^a hora seguinte. O pico pré-ovulatório de estradiol e a redução da progesterona estão relacionados com a rápida maturação folicular, refletindo no aumento da atividade funcional das células da teca e da granulosa do folículo maduro, destinado a ovular (Magiakou *et al*, 1997).

Na fase lútea, as células foliculares estão luteinizadas - sofrem hipertrofia, têm sua capacidade de síntese hormonal aumentada, apresentam aumento de grânulos lipídicos, aumento do volume nuclear e do retículo endoplasmático agranular - e o folículo pós-ovulatório se torna cada vez mais vascularizado. O LH é necessário para a sobrevivência e manutenção das funções normais do corpo lúteo durante o ciclo reprodutivo. A característica mais importante desse período é o aumento acentuado da progesterona secretada pelo corpo lúteo. Há um aumento em paralelo no nível de estradiol, mas sabe-se que esse aumento é menor comparado ao da progesterona. O aumento da progesterona ocasiona o declínio de LH e FSH durante a maior parte da fase lútea. Porém, o FSH começa a elevar-se no final da fase lútea

para iniciar o crescimento folicular do ciclo seguinte (Yen, 1978; Filicori *et al*, 1986; Magiakou *et al*, 1997).

Muitos estudos tem demonstrado que o acúmulo de ferro no eixo HPG está relacionado com o desenvolvimento de anormalidades reprodutivas diretas e/ou indiretas (Roussou *et al*, 2013). Ademais, em pacientes do sexo feminino com acúmulo de ferro no HPG, há uma redução nos níveis basais e pico pré-ovulatório de LH e FSH, levando há uma redução do desenvolvimento folicular ovariano, e conseqüentemente uma menor produção de estrogênio, capacidade ovulatória e corpos lúteos (Asano, 2012). Porém, poucos estudos tem investigado a ação da sobrecarga de ferro aguda sobre a função do HPG em modelos animais.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da exposição à sobrecarga aguda de ferro sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e os parâmetros hemodinâmicos em ratas Wistar.

2.2 Objetivos específicos:

1. Verificar se a exposição aguda ao Fe levou um acúmulo no eixo HPG;
2. Mensurar os níveis de malondialdeído plasmático;
3. Investigar se sobrecarga aguda altera a produção de ânion superóxido;
4. Estudar se o tratamento promoveu alterações na concentração plasmática de estrogênio, LH e FSH;
5. Avaliar os efeitos da exposição ao Fe na morfo-histologia ovariana e uterina;
6. Verificar possíveis efeitos na expressão da proteína do receptor ER- α e ER- β ovariano e uterino;
7. Estudar os efeitos da sobrecarga aguda Fe na função hemodinâmica;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 12 semanas de idade, pesando entre 200 e 300 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (43 cm x 30 cm x 15 cm), sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES - CEUA 010/2013).

3.1.1 Modelo Experimental

Os ratos com três meses de idade, pesando entre 200 e 300 g, foram divididos de forma aleatória em quatro grupos experimentais: controle, Fe 250 mg/Kg, Fe 500 mg/Kg e Fe 1000 mg/Kg (Lucessoli *et al*, 1999). Os animais destinados ao grupo Fe receberam dose única de ferro dextrano via intraperitoneal (i.p), diluídos em NaCl 0,9 %. Os animais do grupo controle receberam apenas solução salina (NaCl a 0,9 %) no mesmo volume de 1,5 ml e período de tempo.

O ferro dextrano possui meia vida plasmática de seis horas. Assim que administrado, o ferro desliga-se do dextrano e é liberado para o sistema onde é armazenado sob a forma de ferritina ou transportado pela transferrina à medula óssea. Sua vantagem é a possibilidade de se trabalhar com doses relativamente altas, em uma única administração (Cançado, 2010). Dessa forma, tornaria possível avaliar o efeito direto da sobrecarga induzido pelo ferro dextrano, ou seja, sem a influência da sua absorção gastrointestinal.

3.2 Determinação das fases do ciclo estral

O ciclo estral foi monitorado duas semanas antes das ratas completarem 3 meses de idade, com intuito de verificar a regularidade prevista de 4 a 5 dias. A ciclagem foi acompanhada através da coleta diária do esfregaço vaginal, de acordo com protocolo adaptado de Marcondes *et al*, (2002). A secreção vaginal foi coletada com uma pipeta contendo 20 µL de solução salina (NaCl a 0,9%) através da inserção suave e superficial da ponta da ponteira na vagina da rata. O volume de salina era liberado no interior da vagina e, subsequentemente, era aspirado e colocado em lâminas de vidro, com uma lamínula por cima do fluido vaginal misturado à salina. Em seguida, essas lâminas foram analisadas no microscópio de luz (Bel Photonics FLUO-2) sem o uso da lente condensadora, com 10x e 40x lentes objetivas.

As fases do ciclo estral foram determinadas por citologia e definidas pela proporção entre os tipos celulares como demonstrado na Figura 2. A fase do proestro foi confirmada quando havia predomínio de células nucleadas epiteliais; uma predominância de células cornificadas caracterizou a fase do estro; a presença de células epiteliais nucleadas, cornificadas e leucócitos em proporções semelhantes, foi um indicativo da fase do metaestro. E por fim, quando houve predomínio de leucócitos a fase foi caracterizada como diestro. As ratas foram tratadas na fase do proestro e após 24 horas iniciamos os protocolos experimentais, onde as ratas se encontravam na fase do estro.

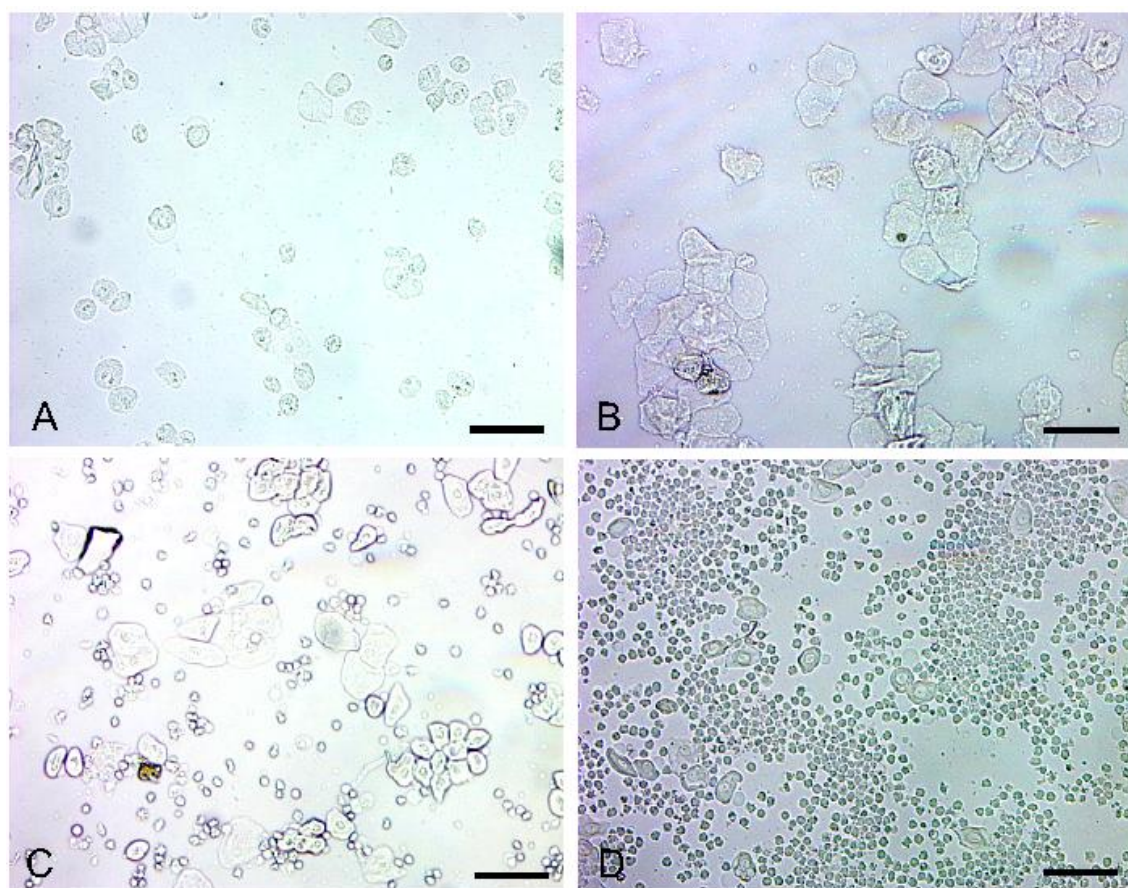


Figura 2: Esfregaço vaginal das ratas. Foto demonstrando A) proestro – predomínio de células epiteliais nucleadas. B) Estro - predomínio de células cornificadas. C) Metaestro – predomínio de leucócitos com presença de células cornificadas e células epiteliais. D) Diestro - predomínio de leucócitos. Imagem A-D (bar: 400 μ m).

3.3 Dosagem hormonal

Após avaliação hemodinâmica, as ratas foram submetidas à laparotomia, onde a artéria aorta abdominal foi puncionada para a coleta de cerca de 5 ml de amostra sanguínea. O sangue coletado foi armazenado em tubos BD SST® II Advance®, que contém ativador de coágulo na parede do tubo para acelerar o processo de coagulação, e foram resfriados em geladeira (4 °C). Posteriormente, essas amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, a 4 °C durante 20 minutos para se obter soro e acondicionado a -20 °C para medições futuras dos níveis de estrogênio, LH e FSH.

As análises hormonais foram realizadas através de kits de ensaio imunoenzimático em microplaca. Para determinação do estrogênio utilizou-se Kit DRG Estradiol Elisa (#42K034 DRG Instruments GmbH, Germany), o LH e FHS foram medidos usando o kit DS-EIA-GONADOTROPIN-LH e Kit DS-EIA-

GONADOTROPIN-FSH (#122043 DA-LH152 and #120037 DA-FSH151 EIA, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., USA).

3.4 Retirada e Pesagem dos Órgãos

Após coleta do sangue, foram removidos os ovários, útero, hipófise, hipotálamo, baço e fígado e pesados (peso úmido) em balança de alta precisão. Posteriormente, os órgãos foram acondicionados na estufa, exceto a hipófise, por 24 horas a 60 °C para análise do peso seco.

3.5 Análise Histológica

Os ovários e útero foram removidos para análise histológica. Fixados em PBS-formol (pH 7,4) por um período entre 24 e 48 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados em xilol e banhados em parafina a 60 °C. Posteriormente, os blocos de parafina contendo os tecidos foram cortados em um micrótomo (Leica RM 2125 RTS), gerando cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e Ferricianeto de Potássio (Azul da Prússia) para determinar acúmulo de ferro ferroso (Fe^{2+}) nos tecidos (Gao *et al*, 2013; Guan *et al*, 2013).

Em cada ovário, os folículos e corpos lúteos foram contados em três cortes por animal e o número foi expresso por nº folículos/campo de luz. Os folículos ovarianos foram posteriormente classificados de acordo com Borgeest *et al*, (2002) e Talsness *et al*, (2005). Os folículos ovarianos pré-antrais foram caracterizados quando apresentaram de duas a quatro camadas de células da granulosa, sem espaço antral. Os folículos ovarianos foram classificados como antrais quando continham três ou mais camadas de células da granulosa e um espaço antral bem definido. Folículos ovarianos atrésicos são os que apresentaram células da granulosa desorganizadas, com núcleos picnóticos, ovócitos degenerados e desorganizados, e descolamento da membrana basal. Os folículos ovarianos primordiais e primários não foram contados. Para a morfometria uterina, cinco diferentes regiões serão analisadas em cada uma das 3 secções e será mensurado a espessura do miométrio, estroma, epitélios

luminal e glandular. Para análise da morfometria uterina, foram avaliadas a área do endométrio uterino (END) e miométrio (MYO), como descrito por Schönfelder *et al*, 2004; Mendoza -Rodriguez *et al*, 2011.

Para a análise histológica, foi utilizado um sistema de análise de imagem que consistiu de uma câmara digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) ligada a um microscópio de luz (Eclipse 400, Nikon). Imagens de alta qualidade (2048 × 1536 pixels) foram capturadas com o Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics).

3.6 Quantificação da produção de ânion superóxido *in situ*

3.6.1 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE) em segmentos de aorta, nos tecidos ovariano e hipófise

Para verificar a influência da exposição do ferro dextrano em 24 horas sobre a produção de $O_2^{\cdot -}$ foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do DHE. O DHE é um derivado do etídio que entra em contato com $O_2^{\cdot -}$, oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha (Wiggers *et al*, 2008). Este método permite analisar a produção “*in situ*” nos segmentos teciduais.

Os segmentos de aorta foram retirados dos animais, bem como amostra do ovário e hipófise, em seguida limpos e mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30 %. Estas amostras foram congelados em meio adequado (meio de congelamento). Posteriormente, foram mantidas a -80° C até o dia do experimento.

Os blocos das amostras foram cortados no criostato com 10 µm de espessura para aorta e 7 µm para ovário e hipófise. Posteriormente, estes cortes foram adicionados em lâminas gelatinadas e secos em estufa a 37° C durante 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e em seguida incubadas com Krebs HEPES (Para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de $CaCl_2$, 759 mg de NaCl, 41,7 mg de KCl, 4,9 mg de $MgCl_2$, 197,8 mg de HEPES e 198,2 de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida à 37 °C. Decorridos os 30 minutos, o Krebs foi escorrido e o excesso seco. Em seguida, foi realizada incubação com DHE 2 µM por duas horas na estufa com câmara fechada a 37 °C. A luminescência emitida foi visualizada com

microscópio fluorescência invertido (Leica DM 2500) e câmara fotográfica (Leica DFC 310 FX) com filtro 568 nm. As imagens foram quantificadas pelo software ImageJ.

3.7 Medida de produção de Malondialdeído (MDA) no plasma

As amostras de plasma dos animais foram coletadas em tubos BD Vacutainer® Plus com heparina jateada na parede interna do tubo, centrifugadas a 4000 rpm a 4 °C por 20 minutos e armazenadas a -80 °C até o dia da análise. As concentrações plasmáticas de MDA foram mensuradas por ensaio modificado de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Wiggers *et al*, 2008). Os radicais livres reagem com os PUFA da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados e, portanto um indicador de peroxidação lipídica.

Após centrifugação do sangue, o plasma foi coletado e misturado ao ácido tricloroacético a 20 % em 0,6 M HCl (1:1 vol/vol) e mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar seus componentes e evitar possíveis interferências. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1500 x g antes de adicionar o TBA (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v). Após, a mistura foi aquecida a 97° C por 30 minutos. A medida foi realizada através da absorbância usando Absorbance Microplate Reader (ELx808TM).

3.8 Análise Espectrométrica

Acredita-se que os efeitos deletérios promovidos pela sobrecarga de ferro estão correlacionados à concentração de ferro no sangue e sua deposição nos diversos órgãos (Siddique & Kowdley, 2012).

Dessa forma, para mensurar a concentração de ferro foram coletados sangue, hipotálamo, hipófise, ovário, útero, coração, fígado e baço e armazenados a -20 °C. Posteriormente, o sangue e os órgãos foram encaminhados ao Laboratório de Espectrometria Atômica (LEA) da UFES,

coordenado pela Professora Maria Tereza para avaliação da concentração de ferro nestes tecidos.

A análise da deposição tecidual e da concentração sanguínea do ferro foi realizada através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica como descrito por Dornelles *et al*, 2008, através do espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite.

3.9 Extração e Dosagem de Proteínas

Alguns ovários e os úteros foram armazenados a -80 °C para a posterior extração de proteínas totais e realização do *western blotting*. O primeiro passo realizado para a extração foi a homogeneização dos tecidos. Para tanto, foi adicionado em cada amostra um volume de 500 µL de tampão de lise 250 mmol/L de sacarose, 1 mmol/L de EDTA, 20 mmol/L de imidazol, pH 7.2, e os seguintes inibidores de protease: 1 mmol/L de fluoreto de 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonil, 1 mmol/L de benzamida, 10 mg/L de leupeptina, 1 mg/L de pepstatina A, 1 mg/L de aprotinina, e 1 mg/L de quimostatina. As amostras foram homogeneizadas a 0°C utilizando um homogeneizador Potter, com 10 incursões por amostra (Graceli *et al*, 2012).

As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 10000×g por 20 minutos. O pellet foi descartado e o sobrenadante de cada amostra foi armazenado a -80 °C em tubos eppendorfs para futura quantificação de proteínas totais. Para a determinação da concentração de proteínas totais o método de Lowry (Lowry *et al*, 1951) foi utilizado.

Um volume de 20 µL do sobrenadante de cada amostra homogeneizada foi utilizado para a dosagem, sendo transferidos para tubos 30 de ensaio, com adição de tartarato de cobre, reagente de folin e água. Tal método se baseia na reação do cobre com a proteína presente em cada amostra, em meio alcalino, e posterior redução do reagente de folin. Quando ocorre a redução do reagente de folin, o resultado é uma cor mais intensa com absorção máxima em 550 nm, logo, quanto mais proteína, mais intensa é a coloração nos tubos. Para a análise de absorbância foi utilizado o espectrofotômetro. A concentração de proteínas é determinada por meio de uma curva padrão previamente

construída com soluções de diferentes concentrações, e o “branco” utilizado para a construção da curva foi albumina soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich).

3.9.1 Western Blotting (Immunoblotting)

Após as dosagens, retiramos o volume necessário de cada amostra para uma concentração de 100 µg/µL em um volume final de 15 µL. Foi colocado em eppendorfs a quantidade de proteína estabelecida por amostra, adicionou-se água e tampão de amostra contendo Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 5% de glicerol, 0.01% de bromofenol azul, e 1.7% de β-mercaptoetanol. As proteínas presentes em cada eppendorf foram solubilizadas, uma vez que os tubos foram colocados em um béquer contendo água a 100 °C. Os eppendorfs foram mantidos nessa temperatura por 5 minutos.

Conforme Celis (2006), o gel SDS-PAGE (do inglês, *polyacrylamide gel electrophoresis*) foi preparado usando 10 % de SDS e poliacrilamida (acrilamida e bisacrilamida). As amostras (15 µL) foram pipetadas cada uma em um poço dos géis e as corridas de eletroforese tiveram duração de 1 hora e 30 minutos cada a 120 Volts. Durante a eletroforese as amostras e os géis se mantiveram imersos em 31 tampão de corrida. Em seguida, em uma cuba com tampão de transferência, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA).

Na transferência, as membranas foram lavadas com tampão tris-salina 0.05% e tween 20 (TBS-T), e bloqueadas com BSA 5 % em solução de TBS-T por 1 hora a 4 °C. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 10 minutos e incubadas com seus respectivos anticorpos primários, isto é, anticorpo policlonal de coelho para o peptídeo da região C-terminal do receptor de estrogênio alfa de ratos, camundongos e humanos (ER-α, diluição 1:500, em 3 % BSA em TBS-T, durante toda a noite a 4 °C) (Santa Cruz Biotechnology, INC) e com anticorpo policlonal de coelho região C-terminal da β-actina de ratos, camundongos e humanos, sendo a β-actina utilizada como controle interno de cada western blotting realizado (β-actina, diluição 1:1000, em 3 % BSA em TBS-T, durante toda a noite a 4 °C) (Santa Cruz Biotechnology, INC).

Depois da incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos cada com TBT-T e em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma). Para a incubação do anticorpo secundário, utilizou-se para anticorpo anti-ER α , anti-ER β (1:1000, em 3 % BSA em TBS-T, por 1 hora a 4 °C) (Sigma Immuno-Chemicals) e anti β -actina (1:4000 em 3 % BSA em TBS-T, por 1 hora a 4 °C). O resultado do western blotting de cada amostra foi visualizado pela adição de 200 μ L de solução estoque dos reveladores NBT (do inglês, *nitroblue tetrazolium chloride*) e BCIP (do inglês, *5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt*, 50 mg/mL) (Life Technologies, Rockville, MD) em 10 mL de solução de tris-HCl e NaCl 0,1 M, pH 9,5, onde as membranas ficaram imersas por 5 minutos, sob agitação em temperatura ambiente. Tais reveladores são utilizados para a detecção colorimétrica da atividade da fosfatase alcalina.

As bandas de ER α , ER β e β -actina foram analisadas por densitometria, por meio de Unidades densitométricas arbitrárias, utilizando o Programa Image J. Para a relativa expressão de ER- α e ER β seus valores foram divididos pelos valores correspondentes de β -actina.

3.10 Medidas Hemodinâmicas

A avaliação direta dos efeitos do ferro dextrano nos parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares foi realizada após 24 horas de exposição ao metal. Os animais de ambos os grupos foram anestesiados com uretana 30% (1,2 g/ Kg, *i.p.*). O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação na dose do anestésico utilizado.

Após o procedimento anestésico, os animais foram submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular direita e da artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares. Para esta cateterização foram utilizadas cânulas de polietileno PE-50 (*Intramedic Polyethylene Tubing*, Clay Adams, Becton, Dickinson and Company, Nova Jérsei, EUA) preenchidas com salina heparinizada (50 U/ml). Tanto a jugular quanto a carótida foram separadas delicadamente do tecido conjuntivo, em seguida a cânula era

inserida e amarrada com um fio sem obstruir o fluxo de sangue. (Parasuraman & Raveendran, 2012).

Os cateteres, já introduzidos nos vasos sanguíneos dos animais, eram acoplados a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador) interligado ao sistema Biopac, o qual permitia que as pressões arteriais, ventriculares e a frequência cardíaca (FC) fossem registradas (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA) e processadas por um computador. Para o processamento dos dados foi utilizado taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo.

Após 20 minutos de estabilização da pressão arterial (PA) e FC foram registrados os seguintes parâmetros: pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM); FC; pressões sistólicas e diastólicas intraventriculares direita (PSVD; PDfVD) e esquerda (PSVE; PDfVE); derivadas de pressão intraventricular (dP/dt) positiva (+) e negativa (-), estas obtidas a partir dos registros de ondas de pressão intraventricular em função do tempo. As variações de dP/dt (+) foram utilizadas como índice de ações inotrópicas e as variações de dP/dt (-) foram utilizadas como índice de ações lusitrópicas.

A pressão ventricular direita foi medida pela introdução do cateter até o ventrículo direito, perfazendo o circuito via veia jugular direita. Já a aquisição da pressão intraventricular esquerda foi obtida com a introdução do cateter através da artéria carótida direita.

3. 11 Expressão e análise estatística dos resultados

A normalidade dos dados foi testada por D'Agostino & Pearson. As comparações entre grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) uma via, seguido do pós-teste (*pos-hoc*) de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O número de animais está demonstrado entre parênteses dentro das barras dos gráficos. Para análise dos dados e aplicação dos testes estatísticos foi utilizado o programa GraphPad Prism Software. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da concentração de ferro plasmático e tecidual

Para avaliarmos a eficácia de nosso modelo em promover a sobrecarga de ferro, após 24 horas de exposição, amostras de sangue e tecidos (fígado e baço) desses animais foram coletadas para dosagem espectrométrica da concentração de ferro nestas repartições. As ratas dos grupos Fe 250, Fe 500 e Fe 1000 apresentaram um aumento significativo dos níveis séricos de ferro quando comparado com o grupo controle (Controle: \leq LD; Fe 250: 1176 ± 47 ; Fe 500: 1861 ± 118 ; Fe 1000: 6050 ± 330 mg/L, $p \leq 0,001$, $n=6$, Figura 3A).

Na figura 3B e C, observa-se que os animais dos grupos tratados apresentaram concentração maior de ferro em comparação aos do grupo controle, dose-dependente. Evidencia-se o acúmulo deste metal nos tecidos do baço (controle: 2280 ± 84 ; Fe 250: 16915 ± 694 ; Fe 500: 20338 ± 1227 ; Fe 1000: 29955 ± 1113 μ g/g, $p \leq 0,01$, $n=6$, Figura 3B) e fígado (controle: 725 ± 23 ; Fe 250: 7123 ± 325 ; Fe 500: 8035 ± 527 ; Fe 1000: 10958 ± 591 μ g/g, $p \leq 0,01$, $n=6$, Figura 3C).

Com o intuito de verificar se o estado oxidante (estresse oxidativo) foi alterado pela sobrecarga de ferro, foi realizada a medida da produção de malondialdeído no plasma (MDA). Como observado na Figura 3D, os níveis MDA foi significativamente maior no Fe 500 e Fe 1000 em comparação com controle (controle: $0,54 \pm 0,1$; Fe 250: $1,15 \pm 0,1$; Fe500: $1,81 \pm 0,2$; Fe 1000: $2,53 \pm 0,5$ mM, $p \leq 0,01$, $n=6-9$, Figura 3D).

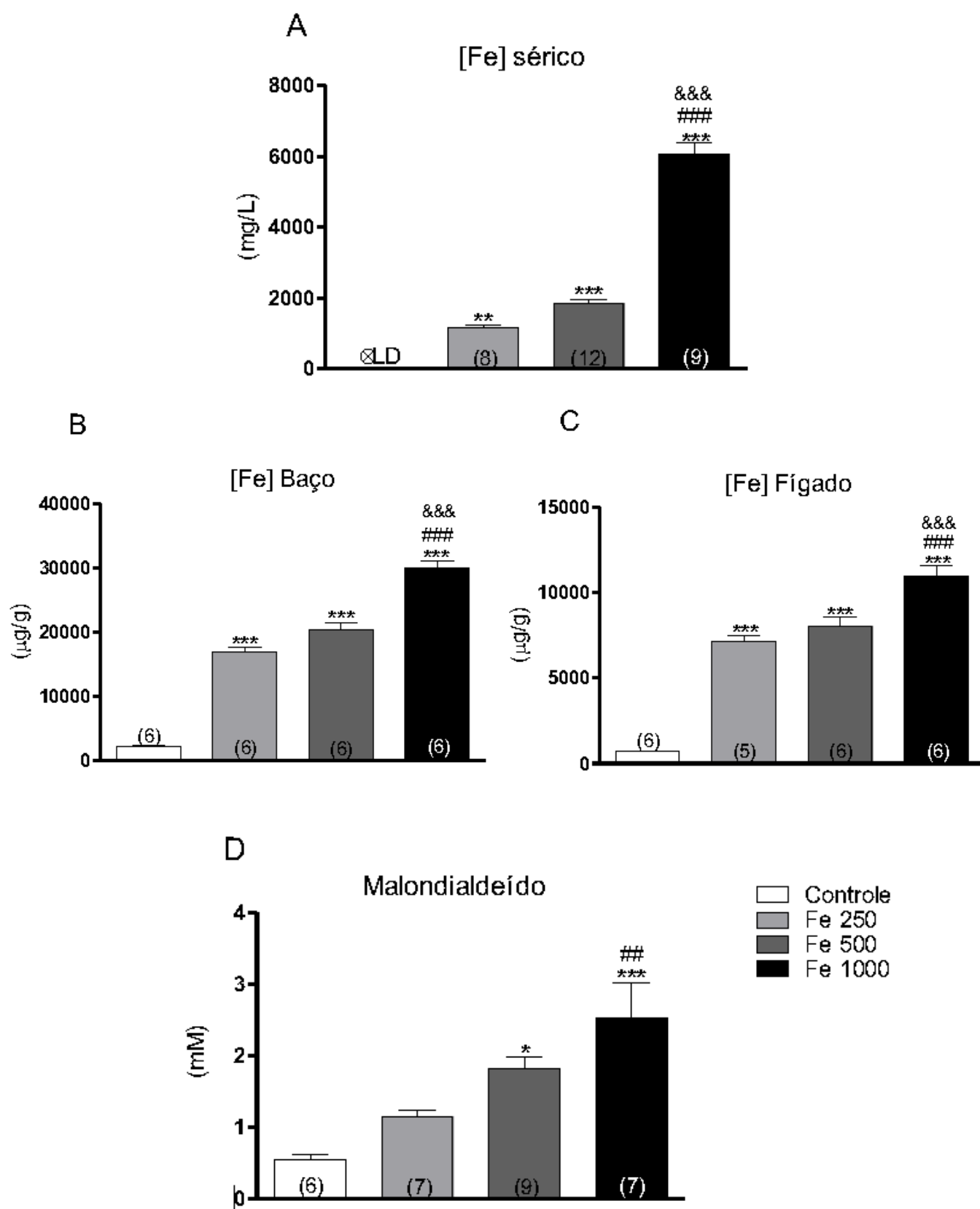
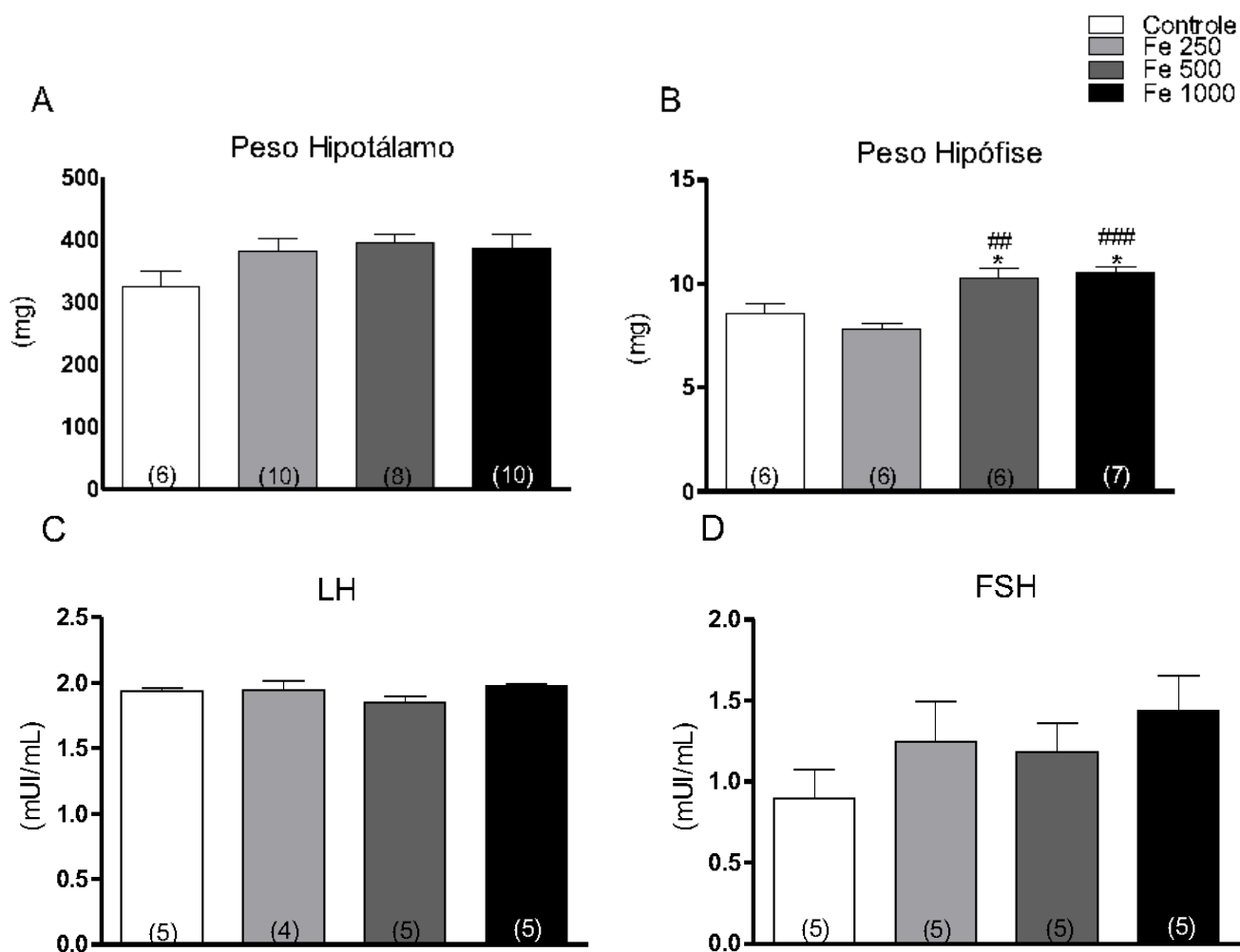


Figura 3. Avaliação do acúmulo de ferro no soro, baço, fígado e MDA plasmático. (A) Soro, (B) Baço e (C) Fígado mensuração do ferro por espectrofotometria absorção atômica. (D) Concentração plasmáticas de MDA. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ vs controle. ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ vs Fe 250. &&& $p \leq 0,001$ vs Fe 500. ANOVA uma-va e pós-teste de Bonferroni.

4.2 Peso dos órgãos e Dosagem Hormonal

Para determinar o efeito da sobrecarga de ferro aguda na função do eixo HPG, os pesos do hipotálamo, hipófise, ovário e útero e os níveis de gonadotrofinas das ratas foram avaliados (Figura 4). Os valores do (A) hipotálamo, (E) ovário e (F) útero não apresentaram variação entre os grupos Fe 250, Fe 500 e Fe 1000 quando comparados ao controle. No entanto, o peso da hipófise apresentou aumento significativo nos grupos Fe 500 e Fe 1000 quando comparado com controle (Controle: $8,6 \pm 0,5$; Fe 250: $7,88 \pm 0,3$; Fe500: $10,3 \pm 0,5$; Fe 1000: $10,5 \pm 0,33$ g, $p \leq 0,01$, $n=6$, Figura 4B). As medidas de dosagem hormonal também foram realizadas no plasma desses animais (Figura 4), onde os valores de (C) LH e (D) FSH não apresentaram variação significativa entre os grupos analisados.



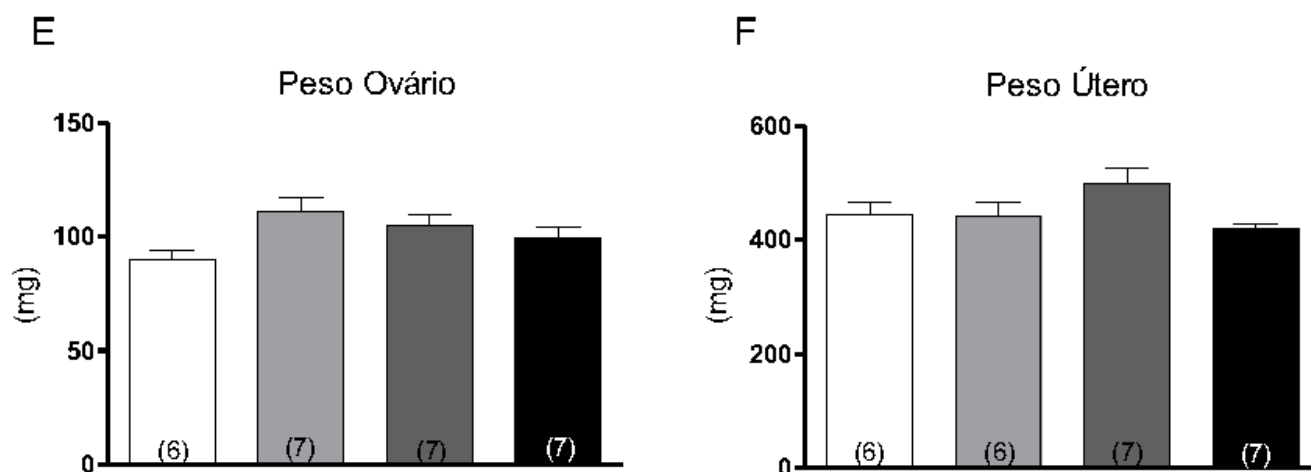
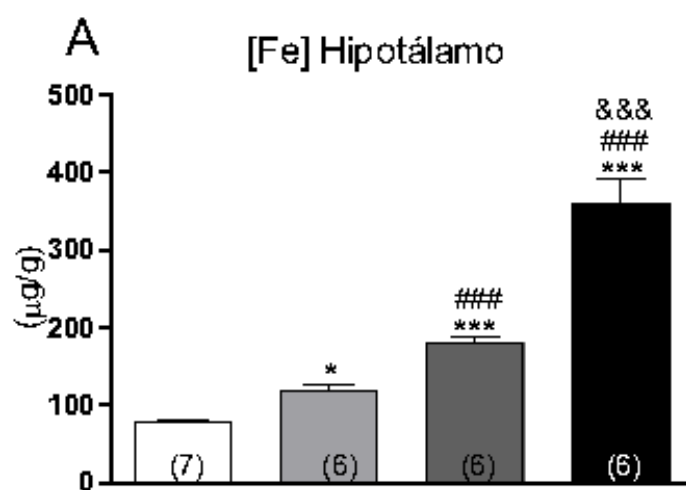


Figura 4. O efeito da sobrecarga de ferro nos pesos hipotálamo, hipófise, ovário e útero e níveis gonadotrofinas. (A) Hipotálamo, (B) Hipófise, (C) LH, (D) FSH, (E) Ovário e (F) Útero. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. $p \leq 0,05$ vs controle; $^{##}p \leq 0,01$, $^{###}p \leq 0,001$ vs Fe 250. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni.

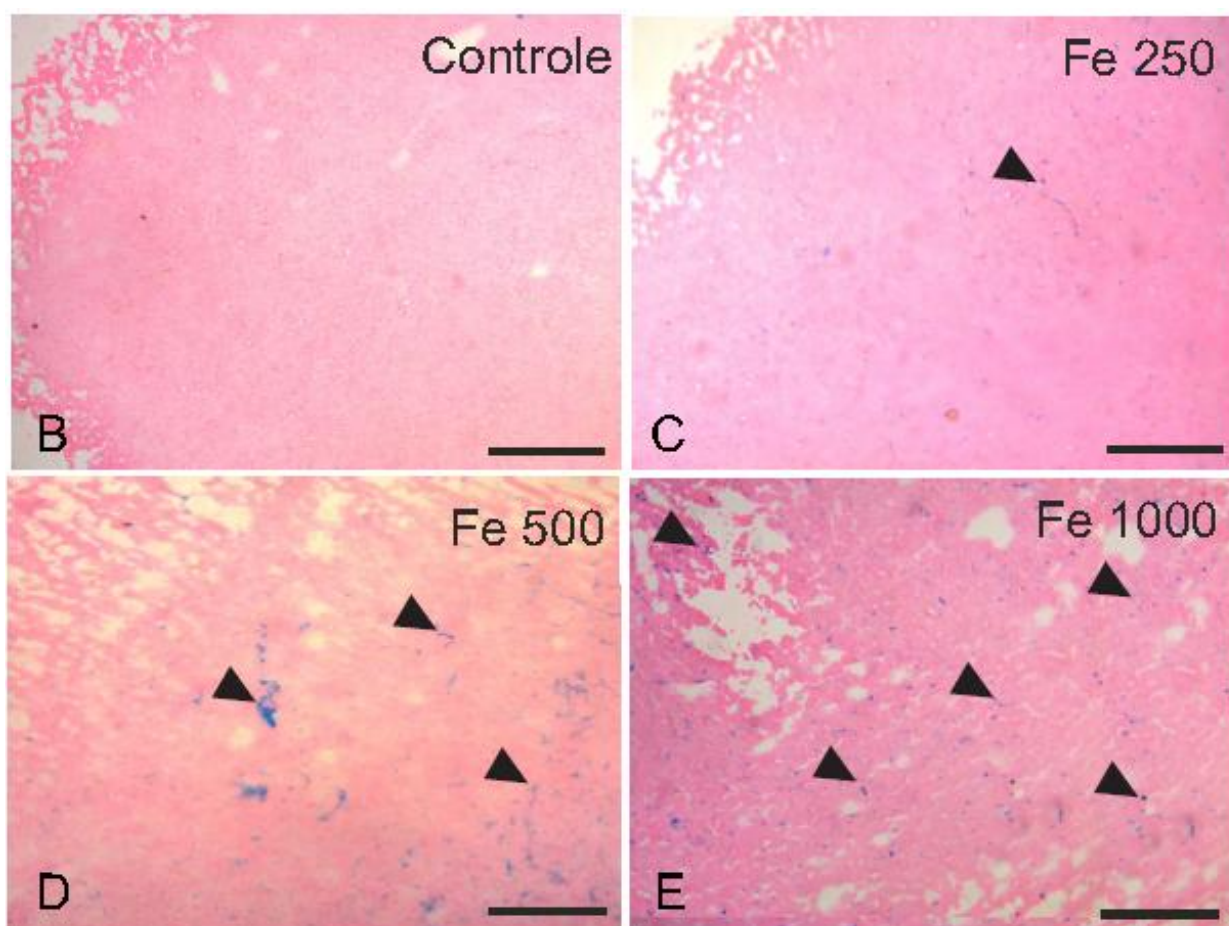
4.3 Efeito da sobrecarga de ferro no eixo hipotálamo-hipófise

Para avaliar os efeitos da sobrecarga aguda de ferro no eixo hipotálamo-hipófise, a concentração de ferro no hipotálamo foi mensurada por espectrometria de absorção atômica. Os grupos Fe 250, Fe 500 e Fe 1000 apresentaram aumento dose-dependente da concentração de ferro quando comparados ao controle (controle: $77,4 \pm 4$; Fe 250: $118,5 \pm 7$; Fe500: $180 \pm 7,7$; Fe 1000: 361 ± 31 $\mu\text{g/g}$, $p \leq 0,01$, $n=6-10$, Figura 5A). O depósito de ferro na hipófise foi avaliado pela coloração azul da Prússia. Observamos na Figura 5 que os grupos (C) Fe 250, (D) Fe 500 e (E) Fe1000 ilustra um acúmulo de ferro maior que no grupo (B) controle.

O acúmulo de Fe na hipófise foi associado ao desenvolvimento geração do estresse oxidativo, onde foi avaliado pela análise do DHE. Foi observado, portanto um aumento da produção de ânion superóxido na hipófise do grupo Fe 1000 quando comparado com o controle. A produção de ânion superóxido no Fe 250 e Fe 500 não foram estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle (controle: $0,06 \pm 0,005$; Fe 250: $0,07 \pm 0,004$; Fe500: $0,07 \pm 0,003$; Fe 1000: $0,09 \pm 0,007$, $p \leq 0,01$, $n=4$, Figura 5J).



[Fe] Hipófise



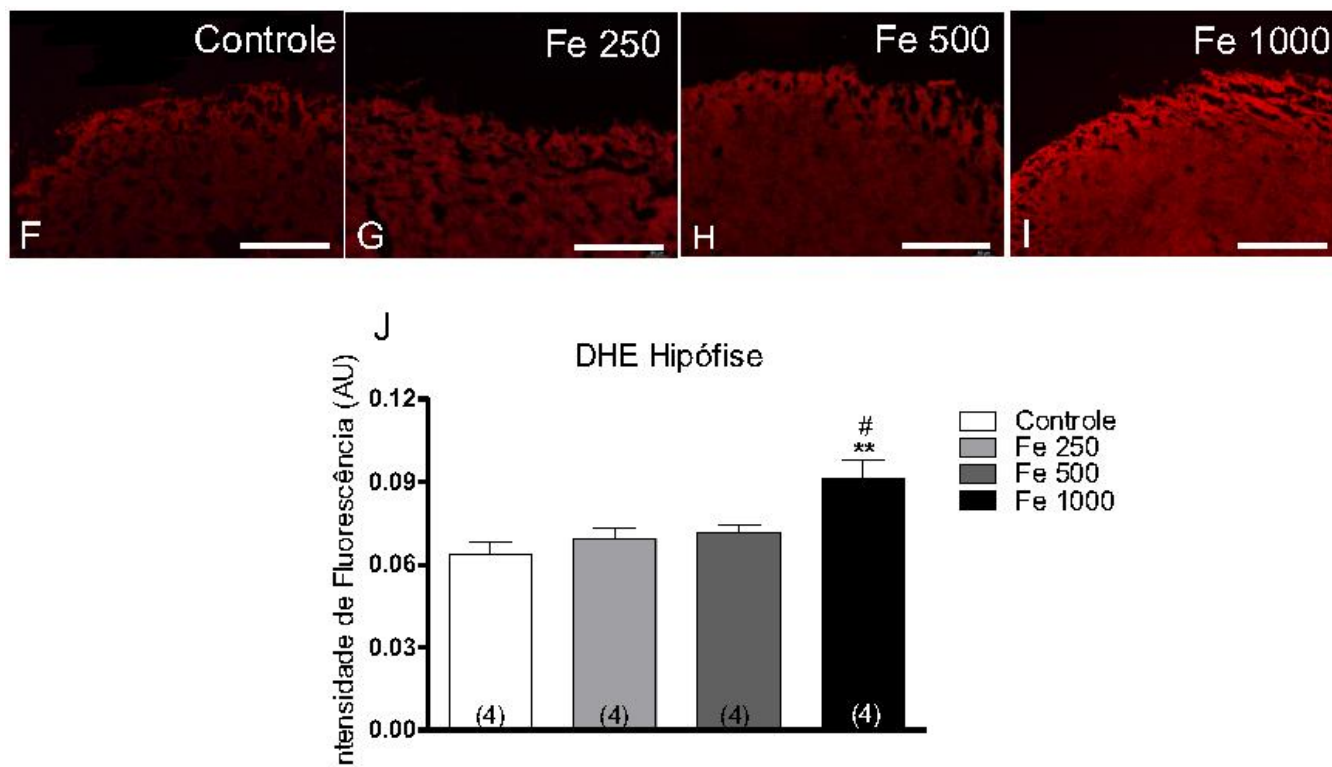


Figure 5. Avaliação do acúmulo de ferro no eixo hipotálamo-hipófise e a produção de ânion superóxido na hipófise. Mensuração de ferro no (A) Hipotálamo, por espectrofotometria de absorção atômica. Acúmulo de ferro na hipófise avaliado por coloração da Azul Prússia (B) Controle, (C) Fe 250, (D) Fe 500 e (E) Fe 1000. Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em seções da hipófise (F) Controle, (G) Fe 250, (H) Fe 500 e (I) Fe 1000. (J) Gráfico representativo da quantificação de ânion superóxido. Os resultados estão expressos em média \pm EPM. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ vs controle. # $p \leq 0,05$; ### $p \leq 0,001$ vs Fe 250. &&& $p \leq 0,001$ vs Fe 500. ANOVA uma-*via* e pós-teste de Bonferroni. Imagem A-D (bar: 80 μ m).

4.4 Avaliação da sobrecarga de ferro nos ovários

O acúmulo de ferro nos ovários foi realizado pelo estudo histológico por meio da técnica de com coloração Azul da Prússia, que cora de azul o acúmulo de ferro no tecido (Figura 6). A deposição de ferro no espaço cortical e medular foi maior nos ovários tratados com ferro, especialmente na região em torno dos folículos do ovário (Figura 6B-D), no Corpo Lúteo - CL (Figura 6F-H) e folículos atresícos (Figura 6J-M).

Corroborando com os resultados mostrados da histologia, análise espectrometria de absorção atômica mostra que o acúmulo de ferro nos ovários é significativamente alta, de modo que o deposição do Fe é dose-dependente (controle: 210 ± 30 ; Fe 250: 1912 ± 405 ; Fe 500: 2812 ± 371 ; Fe 1000: $5550 \pm 580,2$ μ g/g, $n=5-6$, $p \leq 0,01$, Figura 6N).

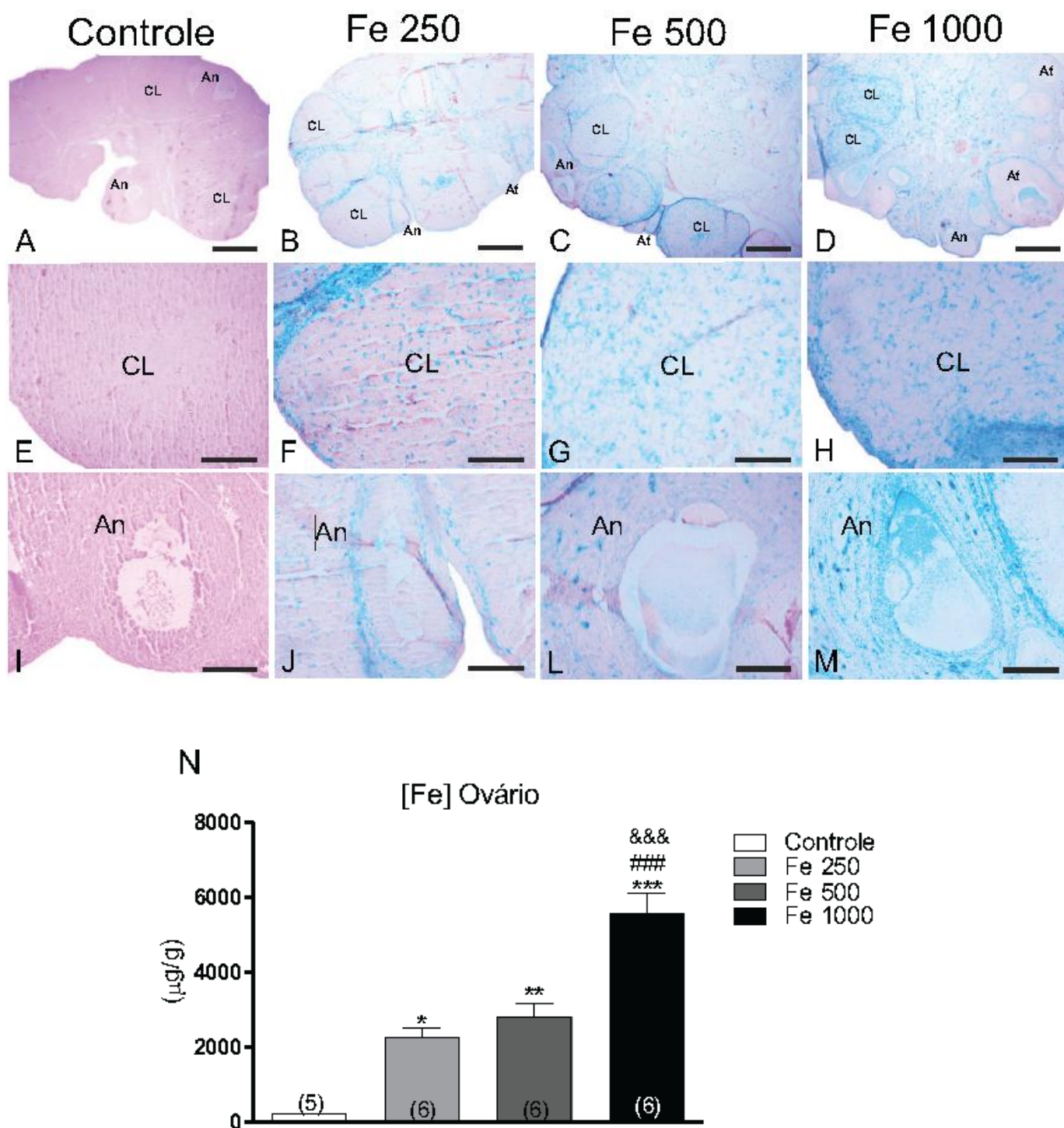


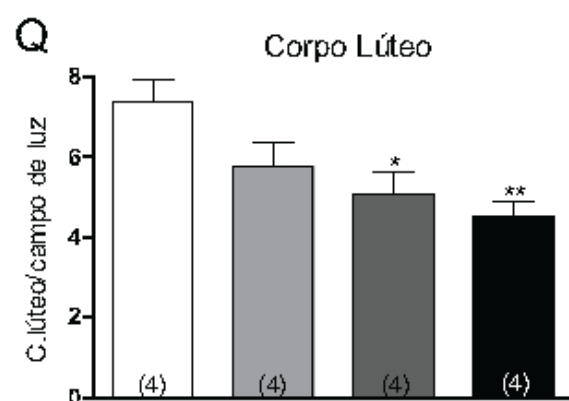
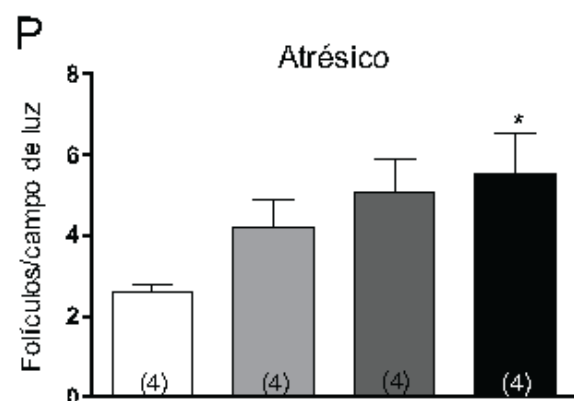
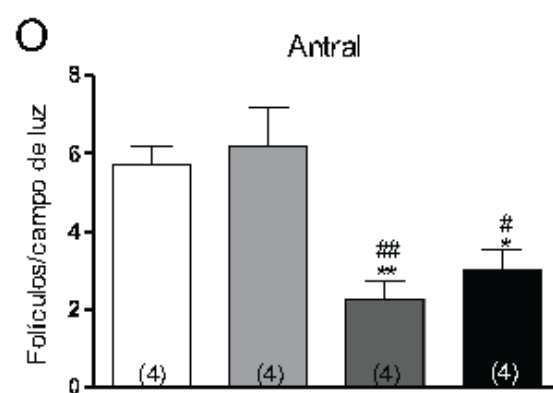
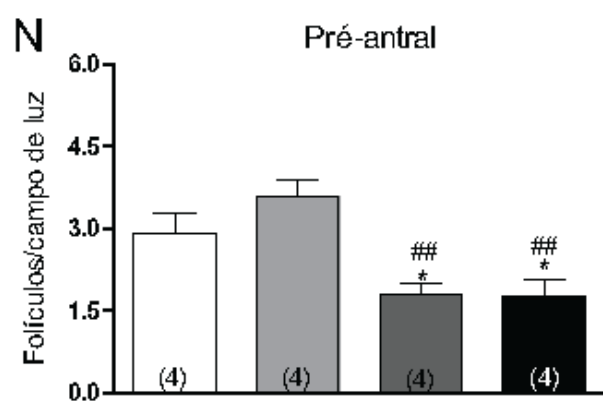
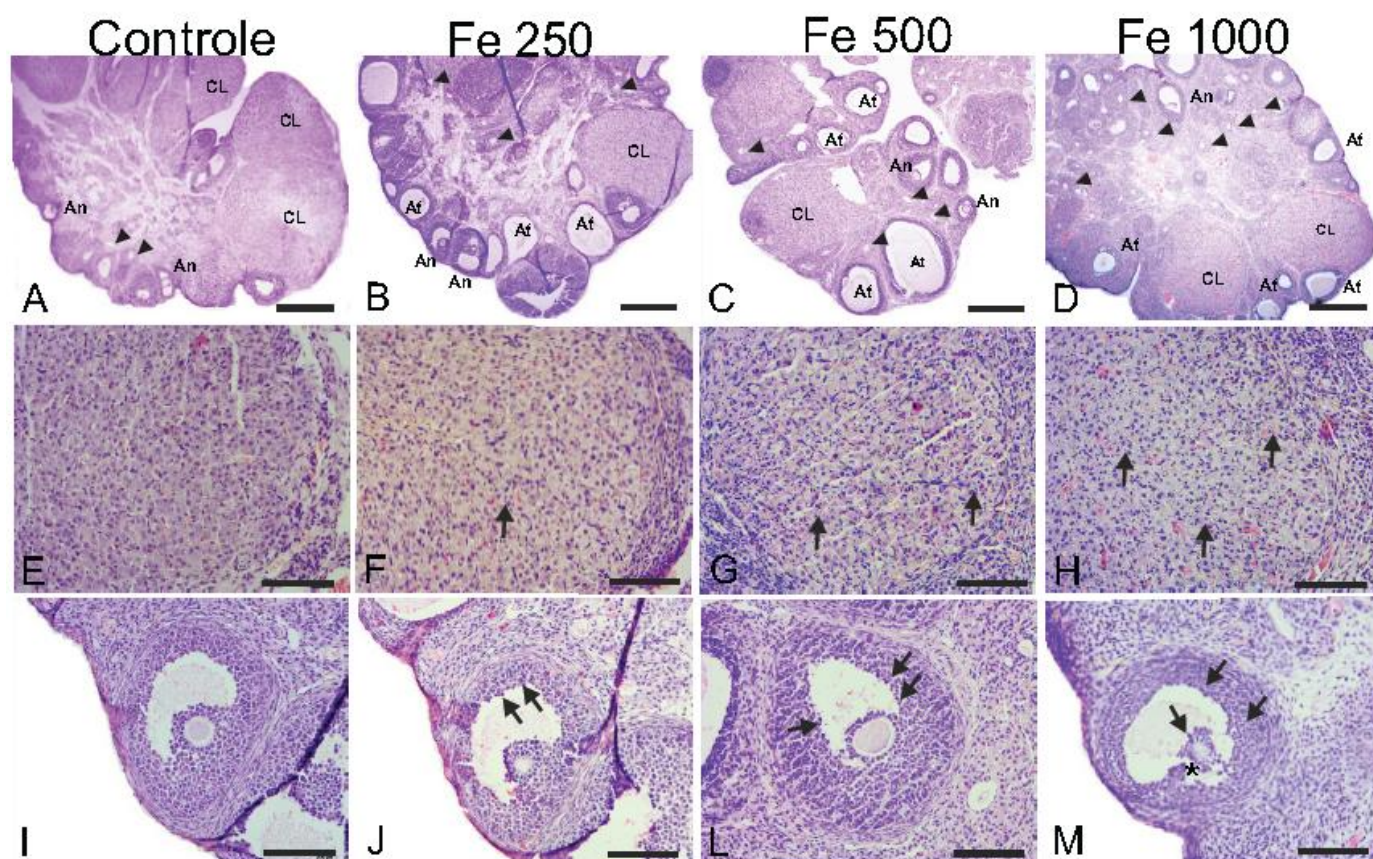
Figura 6. Acúmulo de ferro no ovário avaliada pela coloração da Azul da Prússia. Estrutura dos ovários do grupo controle sem depósito de ferro no (A) estroma, (E) CL e (I) An. Nos grupos (B,F,J) Fe 250, (C,G,L) Fe 500 e (D,H,M) Fe 1000 mostram a coloração de ferro dentro do estroma ovariano, células da granulosa e CL. (N) Quantificação de ferro no ovário realizado por espectrometria atômica. Os valores estão expressos como média \pm EPM. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ vs controle. ### $p \leq 0,001$ vs Fe 250. &&& $p \leq 0,001$ vs Fe 500. ANOVA uma-*via* e pós-teste de Bonferroni. Imagem A-D (bar: 400 μ m); E-M (bar: 100 μ m).

4.5 Efeito da sobrecarga de ferro na morfologia ovariana

Apesar de não termos encontrado alterações macroscópicas diretas no peso dos ovários, modificações morfológicas no tecido ovariano foram analisados. Os cortes histológicos foram submetidos à coloração de H&E e o tratamento com sobrecarga de ferro levou a alterações morfológicas como um prejuízo no desenvolvimento folicular dose-dependente (Figura 7).

As ratas do grupo controle apresentaram folículos antrais, CL, e estrutura do folículo antral com aspecto normal (Figura 7A, E, I). Já as ratas dos grupos Fe 250, Fe 500 e Fe 1000 demonstraram aumento folículos atresícos e aumento de folículos císticos, que são folículos que não conseguem se desenvolver normalmente. Bem como presença de células apoptóticas na área central do CL (Figura 7F, G, H), na camada de células da granulosa e no espaço antral (Figura 7J, L, M). A sobrecarga de ferro aguda acarretou um significativo desequilíbrio no desenvolvimento folicular ovariano, como corroborado pelo aumento no número de folículos atresícos (controle: $2,6 \pm 0,2$; Fe 250: $4,2 \pm 0,7$; Fe 500: $5,0 \pm 0,8$; Fe 1000: $5,5 \pm 1,0$ n°/campo de luz, $n=4$, $p \leq 0,05$, Figura 7P), redução do número de CL (Controle: $7,4 \pm 0,5$; Fe 250: $5,8 \pm 0,6$; Fe 500: $5,1 \pm 0,5$; Fe 1000: $4,5 \pm 0,4$ n°/ campo de luz, $n=4$, $p \leq 0,05$, Figura 7Q), o número de folículos pré-antrais (controle: $2,6 \pm 0,4$; Fe 250: $3,6 \pm 0,3$; Fe 500: $1,8 \pm 0,2$; Fe 1000: $1,7 \pm 0,3$ n°/ campo de luz, $n=4$, $p \leq 0,01$, Figura 7N) e antrais (controle: $5,7 \pm 0,4$; Fe 250: $6,2 \pm 1,0$; Fe 500: $2,3 \pm 0,4$; Fe 1000: $3,0 \pm 0,5$ n°/ campo de luz, $n=4$, $p \leq 0,05$, Figura 7O).

Os animais do grupo Fe 500 e Fe 1000 apresentaram concentrações plasmáticas de estrogênio menores quando comparados ao controle (controle: 20 ± 4 ; Fe 250: $20 \pm 1,6$; Fe 500: $10,3 \pm 1,0$; Fe 1000: $9,5 \pm 1,5$ pg/mL, $p \leq 0,05$, $n=5-6$, Figura 7R).



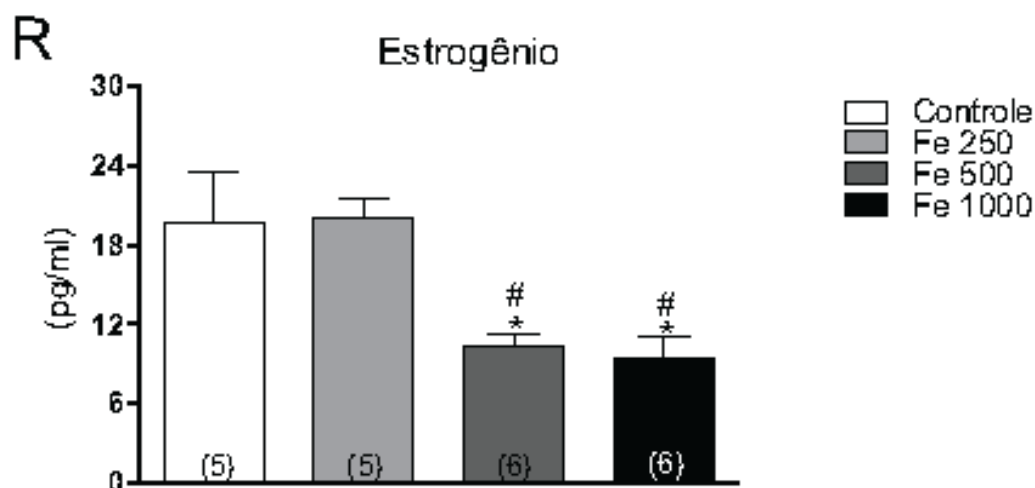


Figura 7. Sobrecarga de ferro aguda no desenvolvimento folicular ovariano. Fotografias microscópicas representativas de ovário corados com H&E. (A, E, I) Grupo controle apresentou desenvolvimento folicular regular e CL normal. Os ovários dos grupos do ferro apresentaram anormalidades morfológicas, com prejuízo no desenvolvimento folicular dose- dependente. (B, C, D) Fotomicrografia de baixa ampliação mostrou folículos antrais (An), folículos atresicos (At), CL e presença de folículos císticos (indicados pela setas pretas). (F) Fe 250, (G) Fe 500 e (H) Fe 1000 mostra presença de células apoptóticas na área central do CL (seta preta). (J) Fe 250, (L) Fe 500 e (M) Fe 1000 folículos antrais mostraram ruptura na oócito. Folículos ovarianos e CL foram contados por campo de luz. (N) Pré-antral, (O) Antral, (P) Atresico e (Q) CL. (R) avaliação dos níveis de estrogênio na fase do estro. Os valores estão expressos como média \pm EPM. $p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$ vs controle. $#p \leq 0,05$; $##p \leq 0,01$ vs Fe 250. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Imagem A-D (bar: 400 μ m); E-M (bar: 100 μ m)

4.6 Avaliação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) com sobrecarga de ferro nos ovários

O aumento do Fe livre, ou seja, não ligado a transferrina pode ocasionar a geração de EROs e consequentemente estresse oxidativo. (Shazia, 2012). Dessa forma, podemos observar um aumento na produção de ânion superóxido no ovário nos grupos Fe 250, Fe 500 e Fe 1000 quando comparado com o controle. (controle: $0,2 \pm 0,03$; Fe 250: $0,3 \pm 0,04$; Fe500: $0,3 \pm 0,02$; Fe 1000: $0,4 \pm 0,02$; $p \leq 0,01$, $n=4$, Figure 8A-E).

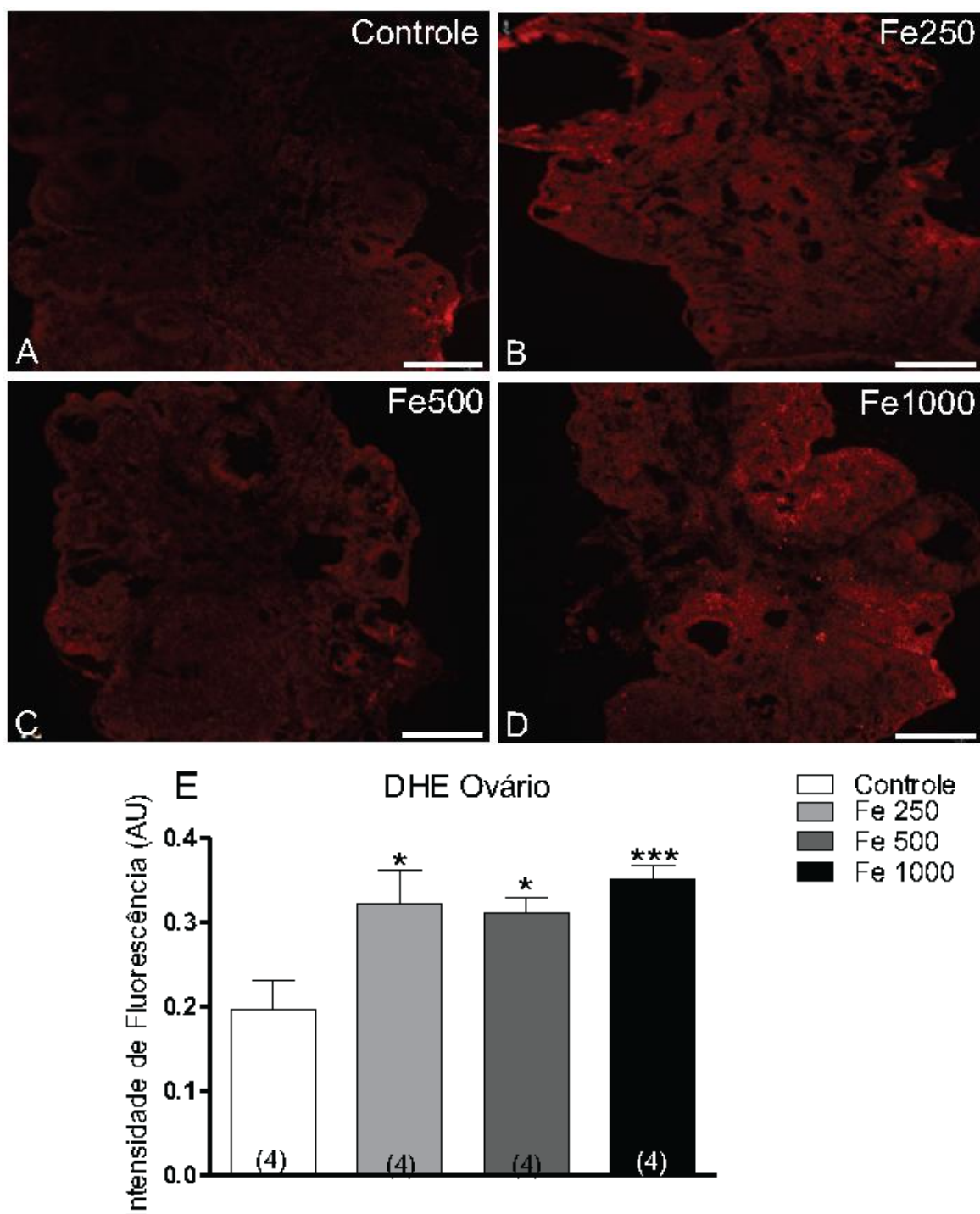
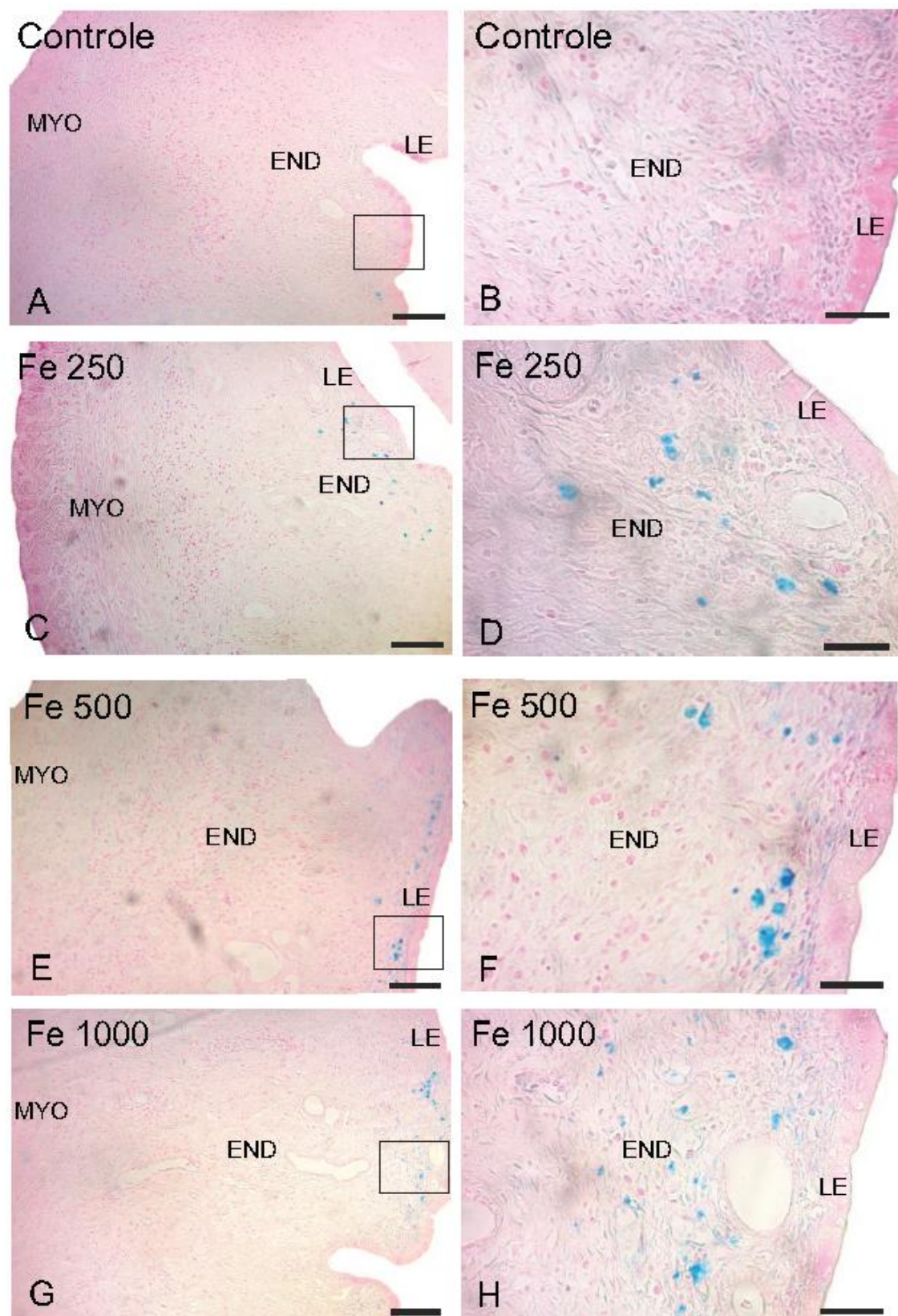


Figura 8. Sobrecarga aguda de ferro na produção de ânion superóxido ovariano. Fotomicrografia de fluorescência emitida por dihidroetídio em tecido ovariano. (A) Controle, (B) Fe 250, (C) Fe 500 e (D) Fe 1000. (E) Gráfico representativo da quantificação de ânion superóxido. Os resultados estão expressos em média \pm EPM. $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$ vs controle. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Imagem A-D (bar: 60 μ m).

4.7 Avaliação da sobrecarga de ferro no útero

Estudos histológicos foram realizados para avaliar a acumulação de Fe no útero, como mostrado pela coloração azul da Prússia (Figura 9). O acúmulo de ferro foi maior nos grupos tratados com ferro dextrano, sendo mais evidente essa deposição na região do endométrio uterino. Portanto, a coloração intensa foi observada de acordo com o aumento da dose Fe 250 (Figura 9C-D), Fe 500 (Figura 9E-F) e Fe 1000 (Figura 9G-H) quando comparado controle (Figura 9A-B). Os resultados da análise de espectrofotometria confirmam que acúmulo de Fe no útero foi maior nos grupos tratados (controle: $147,4 \pm 8,6$; Fe 250: $1048 \pm 190,1$; Fe 500: $2390 \pm 352,4$; Fe 1000: $3591 \pm 671,1$ $\mu\text{g/g}$, $n=5-7$, $p \leq 0,01$, Figura 9I).



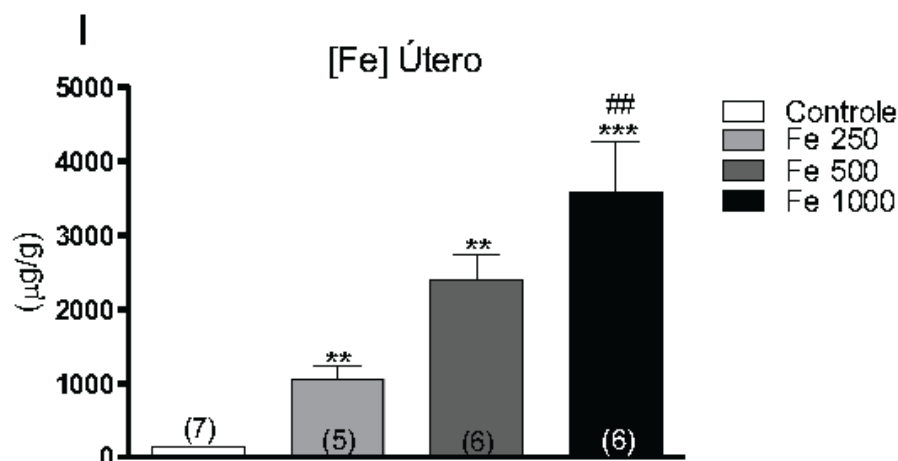
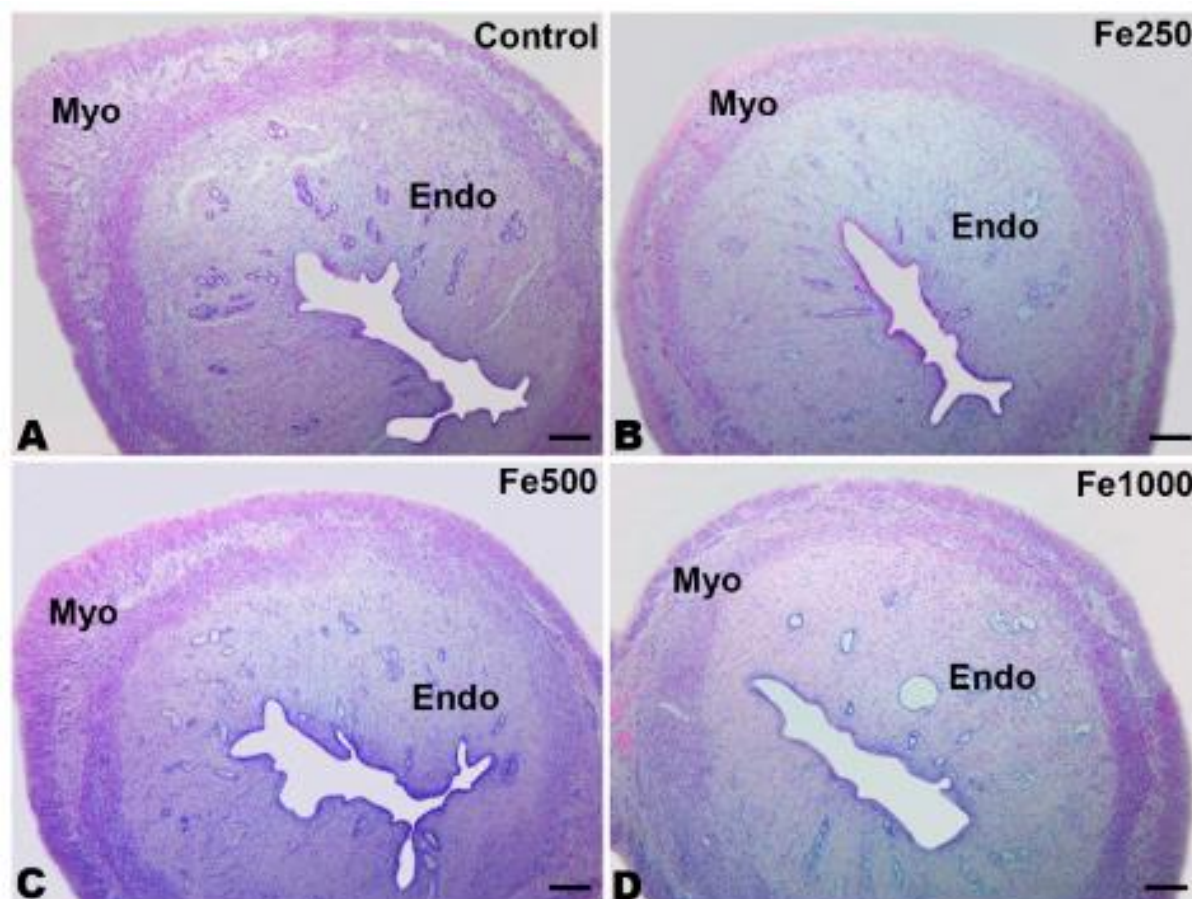


Figure 9. Avaliação do acúmulo de ferro no útero. Fotografias microscópicas representativas de útero corados com Azul da Prússia. Cortes do útero mostrando a estrutura do epitélio luminal (LE), endométrio (END) e miométrio (MYO). (A-B) grupo controle sem presença de ferro. No entanto, Fe 250 (C-D), Fe 500 (E-F) e Fe 1000 (G-H) mostra um acúmulo principalmente na região do END. (I) Mensuração do ferro no útero pela análise de espectrofotometria de absorção atômica. Os resultados estão expressos em média \pm EPM. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ vs controle; ### $p \leq 0,01$ vs Fe 250. ANOVA uma-*via* e pós-teste de Bonferroni. Imagem A-D (bar: 400 μm); E-M (bar: 100 μm).

4.8 Efeito da sobrecarga de ferro na morfometria uterina

As seções útero foram coradas com H&E, para verificar o efeito da sobrecarga aguda de Fe na morfometria uterina. A área do endométrio e miométrio foi semelhante entre os grupos analisados. Portanto, a exposição ferro por 24 horas não foi capaz de alterar a morfometria uterina diretamente.



□ Controle
 ■ Fe 250
 ■ Fe 500
 ■ Fe 1000

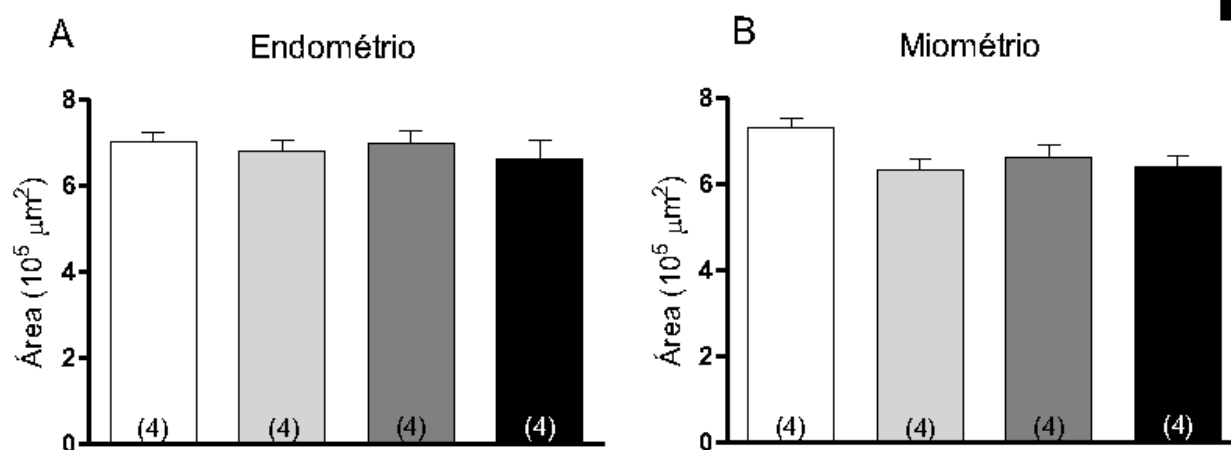


Figure 10. Efeitos da sobrecarga aguda de ferro sobre a morfometria uterina. Seções de útero corados com H&E do (A) controle, (B) Fe 250 , (C) Fe 500 e (D) Fe 1000, mostra histologia típica uterina, bem como a área do endométrio (END) e no miométrio (MYO). (E) Gráfico representativo da área END. (F) Gráfico representativo da área MYO. Os valores estão expressos como média ± EPM. ANOVA uma-va e pós-teste de Bonferroni. Imagem A-D (bar: 50 μm).

4.9 Efeito da sobrecarga aguda de ferro nos receptores de estrogênio ovarianos e uterinos

A expressão dos receptores ER α e ER β foi avaliada no controle, Fe 250, Fe 500 e Fe 1000 ovários e úteros utilizando um ensaio de imunoblotting. Não houve diferença na expressão do receptor ER α e ER β nos ovários (Figura 11A e C) e no útero dos grupos analisados (Figura 11B e D).

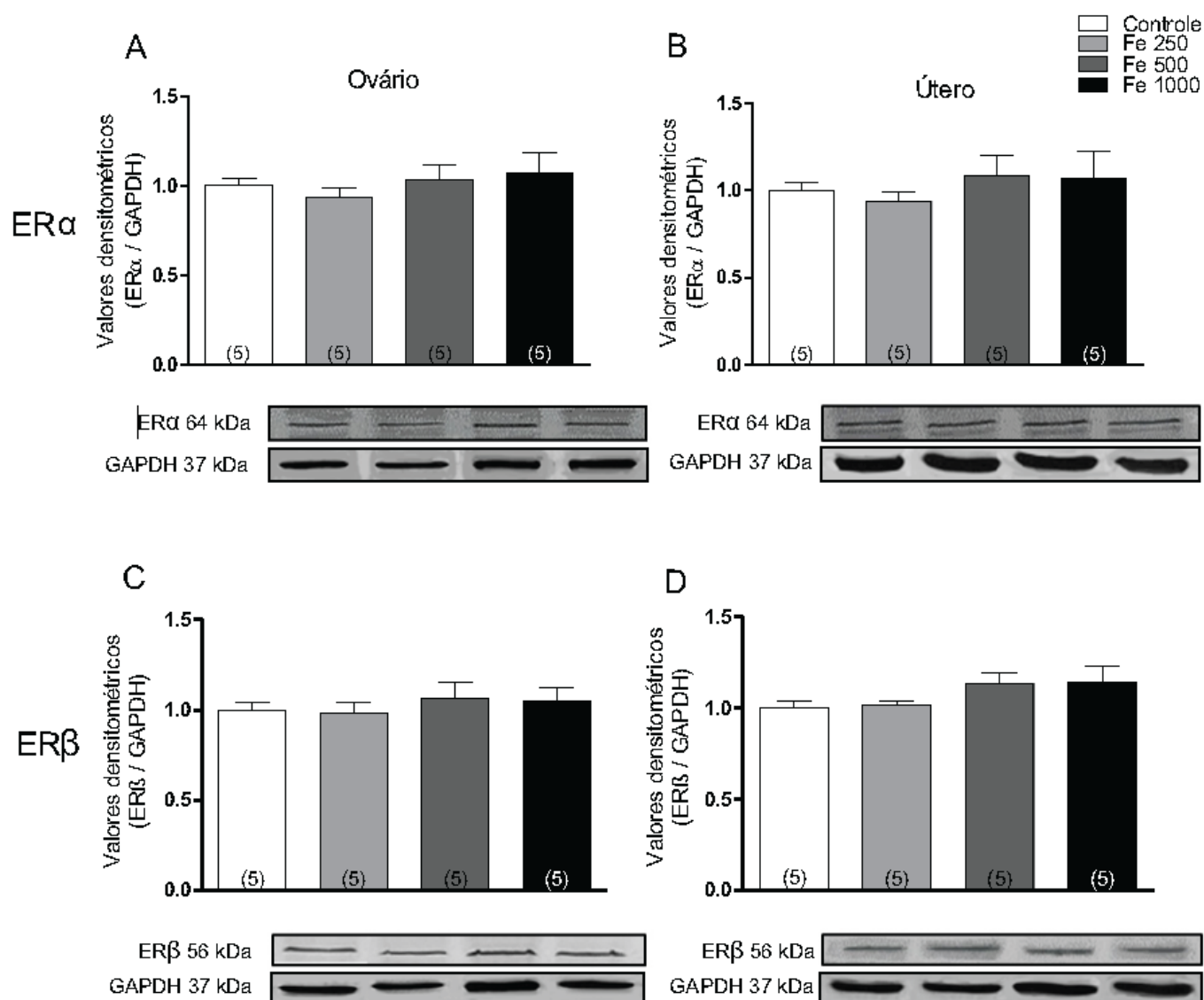
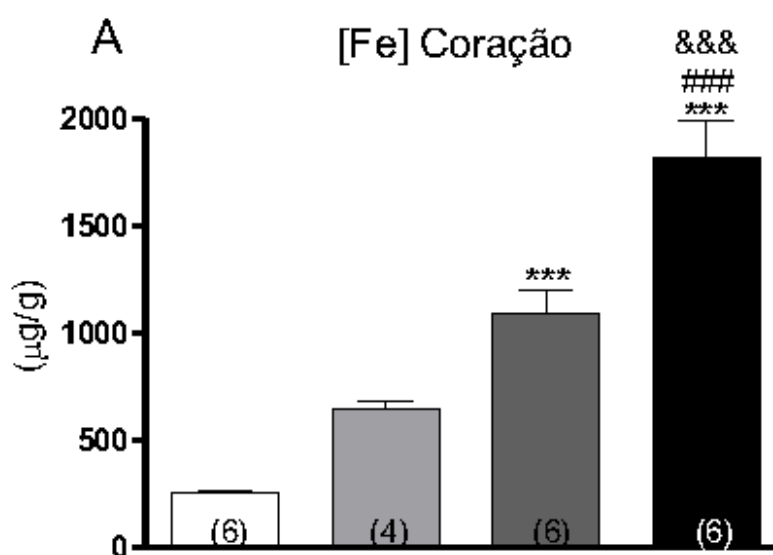


Figure 11. Análise western blot para proteínas ER α e ER β . (A e C) ovário e (B e D) útero nos grupos Controle, Fe 250, Fe 500 e Fe 1000. Os valores estão expressos como média \pm EPM. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni.

4.10 Efeito da sobrecarga de ferro no coração e produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em segmentos aórticos

O acúmulo de ferro no coração pode resultar aumento do estresse oxidativo e a geração de EROs (Oudit *et al*, 2003; Lou *et al*, 2009; Kramer *et al*, 2012). Portanto, investigamos pela análise de espectrofotometria de absorção atômica a concentração de ferro no coração. Podemos observar aumento dose dependente na concentração (controle: 251 ± 12 ; Fe 250: $640,5 \pm 41$; Fe 500: 1095 ± 102 ; Fe 1000: $1814 \pm 172,3$ $\mu\text{g/g}$, $n=4-6$, $p \leq 0,01$, Figura 12A).

A partir disto, verificamos se esse acúmulo foi capaz de alterar na produção de ânion superóxido em segmentos de aorta. Os resultados da análise do DHE, confirmam aumento na produção $O_2^{\cdot-}$ nos grupos Fe 500 e Fe 1000, corroborando com dado anterior (controle: $45,4 \pm 3$; Fe 250: $62,2 \pm 2,5$; Fe500: $71 \pm 5,2$; Fe 1000: $74,3 \pm 4$; $p \leq 0,01$, $n=5-8$, Figure 12B-F).



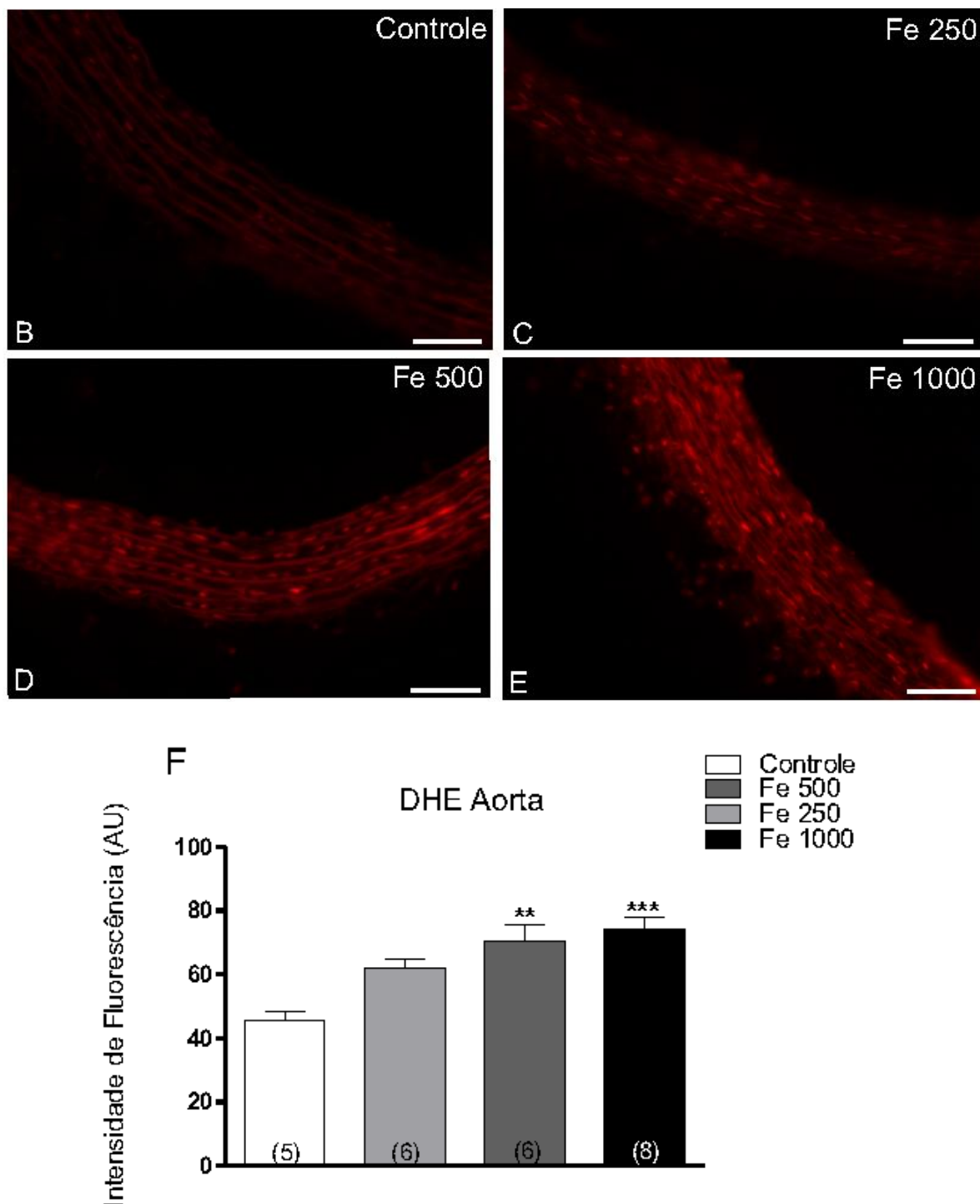


Figura 12. Sobrecarga aguda de ferro na produção de ânion superóxido em segmentos aórticos. (A) Mensuração do ferro no coração pela análise de espectrofotometria de absorção atômica. Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de aorta. (B) Controle, (C) Fe 250, (D) Fe 500 e (E) Fe 1000. (F) Gráfico representativo da quantificação de ânion superóxido. Os resultados estão expressos em média \pm EPM. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ vs controle; ### $p \leq 0,001$ vs Fe 250. &&& $p \leq 0,001$ vs Fe 500. ANOVA uma-*via* e pós-teste de Bonferroni. Imagem B-E (bar: 60 μ m).

4.11 Avaliação Hemodinâmica

Os parâmetros arteriais e o desempenho ventricular foram avaliados através de medidas hemodinâmicas dos animais anestesiados, após 24 horas de exposição. A sobrecarga de ferro aguda não foi capaz de alterar diretamente nos parâmetros pressóricos arteriais e na FC, como demonstrado na Figura 13.

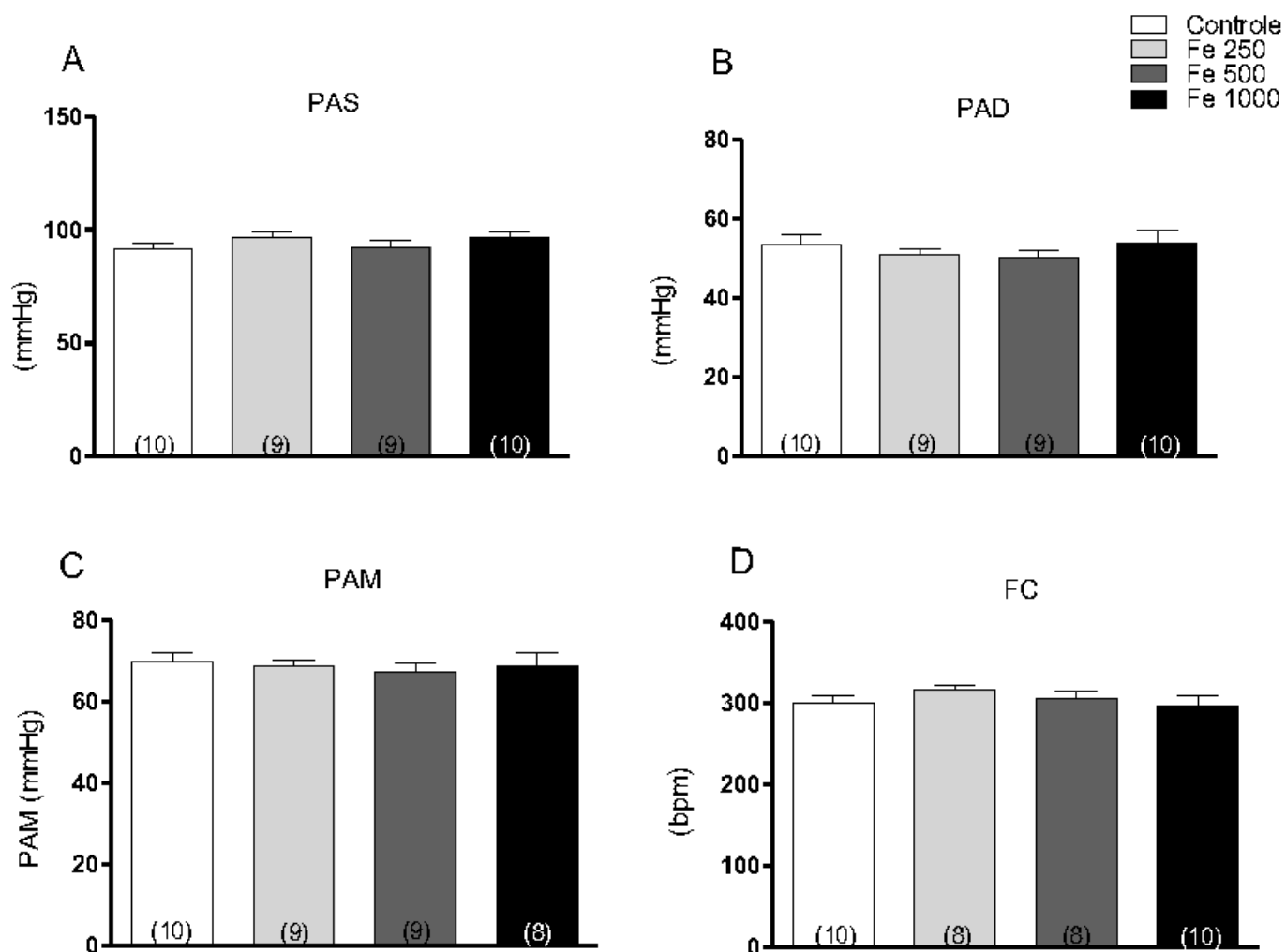


Figura 13. Avaliação de parâmetros pressóricos arteriais e FC. (A) Pressão arterial sistólica; (B) Pressão arterial diastólica; (C) Pressão arterial média; (D) Frequência Cardíaca. Os valores estão expressos como média \pm EPM. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni.

Na avaliação do desempenho ventricular esquerdo, como demonstrado na Figura 14, a exposição aguda ao ferro não foi capaz de elevar a PSVE, assim como as derivadas temporais de pressão, tanto a positiva como a negativa.

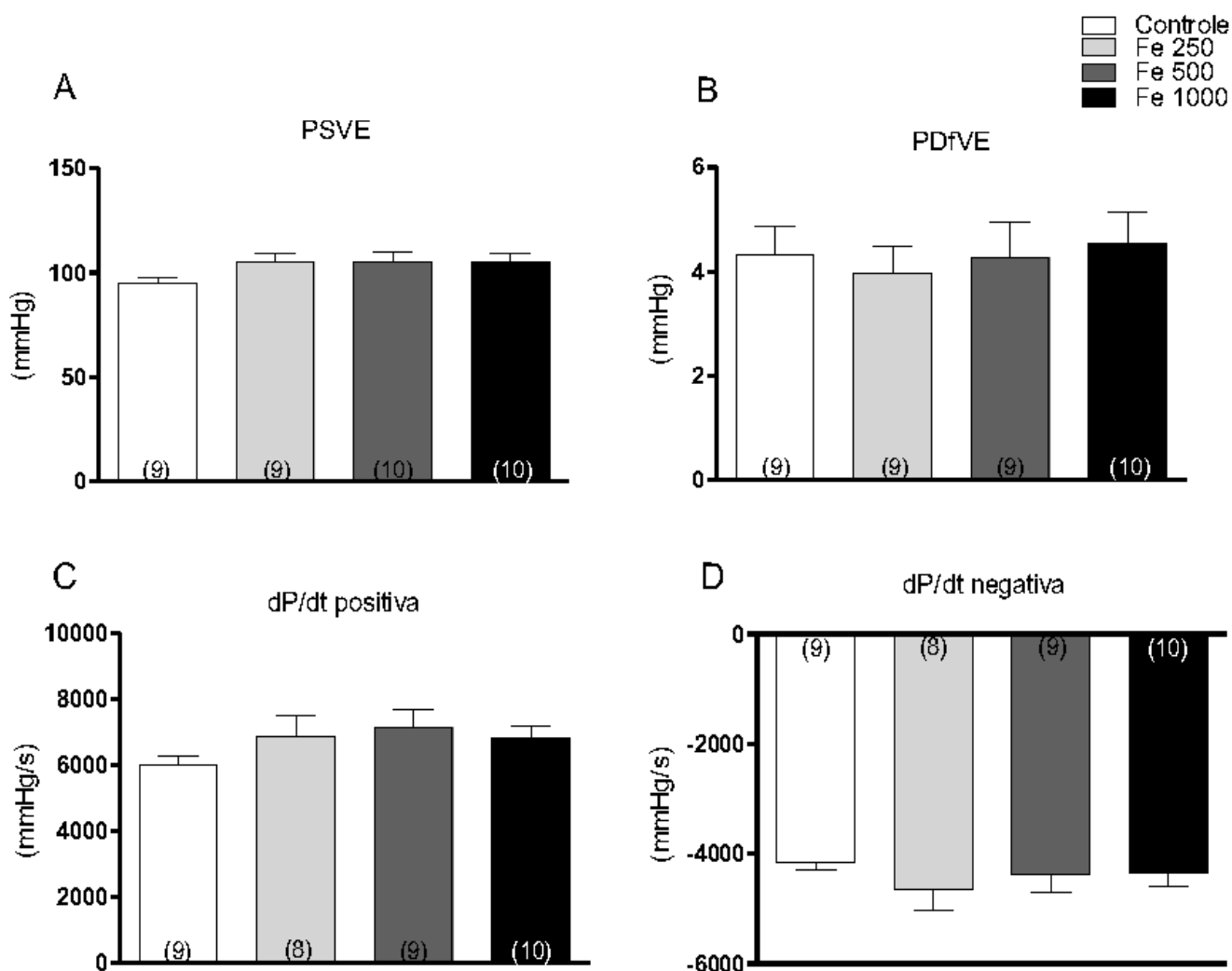


Figura 14. Avaliação de parâmetros hemodinâmicos ventriculares esquerdo. (A) Pressão sistólica ventrículo esquerdo; (B) Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; (C) Derivada temporal de pressão positiva; (D) Derivada temporal de pressão negativa. Os valores estão expressos como média \pm EPM. ANOVA uma- via e pós-teste de Bonferroni.

Quando investigamos os efeitos do ferro nos parâmetros pressóricos e contráteis do VD, observa-se, na figura 15 A, que a sobrecarga aguda de ferro modificou apenas na PSVD do grupo Fe 500 comparado com controle (controle: $27,2 \pm 1$; Fe 250: 30 ± 1 ; Fe500: $31,4 \pm 0,8$; Fe 1000: $28,2 \pm 1,5$ mmHg;

$p \leq 0,05$, $n=8-10$, Figure 15A). Já a PDfVD e as derivadas temporais de pressão avaliados nesta câmara, não apresentaram alteração com o tratamento.

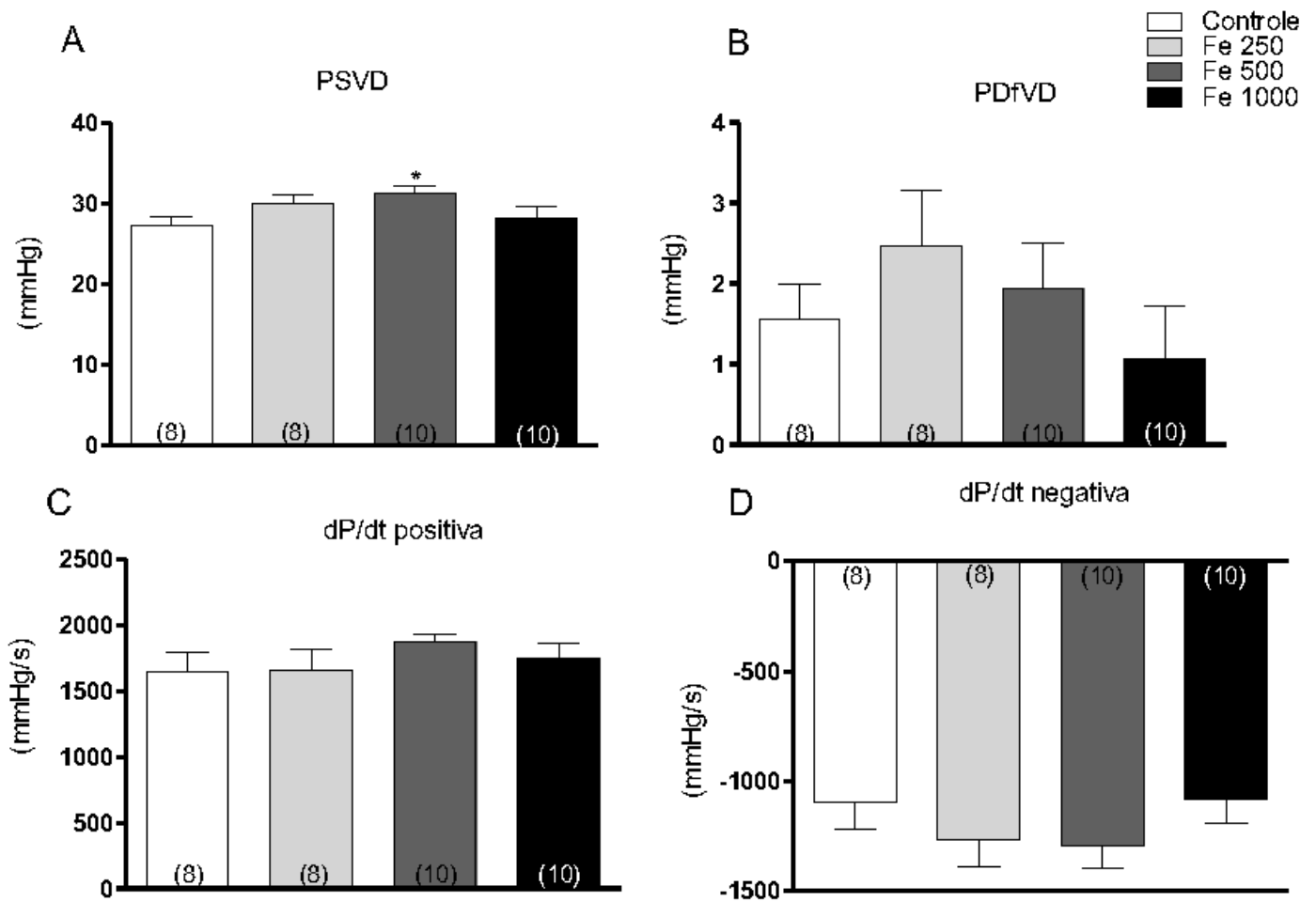


Figura 15. Avaliação de parâmetros hemodinâmicos ventriculares direito. (A) Pressão sistólica ventrículo direito; (B) Pressão diastólica final do ventrículo direito; (C) Derivada temporal de pressão positiva; (D) Derivada temporal de pressão negativa. Os valores estão expressos como média \pm EPM. $p \leq 0,05$ vs controle. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

O ferro é um metal presente nos diferentes tecidos do corpo dos mamíferos, desempenhando um papel crucial em diversos processos fisiológicos normais. Em fêmeas, o ferro é importante para a função endócrina normal, como também para o controle apropriado do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG) tal como o desenvolvimento folicular e a formação do corpo lúteo.

Contudo, uma vez que as funções do ferro estão presentes nas células do eixo reprodutivo periférico, a sinalização precisa diretamente ao eixo HPG sobre a função reprodutiva de mamíferos não é bem compreendida. Assim, estudos prévios usando modelos de sobrecarga de ferro mostraram que seu acúmulo prejudicou a manutenção da função normal do eixo HPG tal como a flutuação da concentração de LH e a foliculogênese ovariana. (Safarinejad, 2010; Asano, 2011). Esta carência de pesquisas enfatizando o efeito de uma sobrecarga aguda de ferro nos impulsionou a investigar seus efeitos deletérios em um modelo de avaliação do trato reprodutivo. Assim, nós fornecemos evidências de que o acúmulo agudo de ferro que é criticamente responsável pelo mau funcionamento do eixo HPG é dependente da produção de EROs e sua sinalização sobre o trato reprodutivo.

Estudos prévios usando diferentes sobrecargas de ferro registraram aumento da concentração de ferro no sangue ou seu acúmulo nos tecidos (Lucessoli *et al*, 1999; Yamaguchi, 2008; Asano, 2011). Nossos resultados estão de acordo com achados prévios mostrando um aumento dos níveis séricos de ferro, bem como um acúmulo de ferro dose-dependente no baço e no fígado. Brewer *et al*, (2014) reportaram um aumento de ferro cardíaco e hepático de camundongos submetidos a uma dieta com alto teor de ferro por oito semanas. De forma interessante, um grande acúmulo de ferro foi também observado em ratos submetidos a sobrecarga de 20h usando um tratamento com ferro dextrano semelhante ao que realizamos (Lucesoli *et al*, 1999).

Além disso, Galleano e Pintarulo (1994) sugeriram que o tratamento com ferro dextrano assemelha-se a sobrecarga secundária, que tem como características aos pacientes com talassemia. As talassemias são defeitos moleculares que reduzem ou cancelam completamente a síntese de uma ou mais das cadeias polipeptídicas da molécula de hemoglobina.

(Cançado, 2007). Esses defeitos genéticos afetam os processos moleculares envolvidos na expressão dos genes da globina. Tais distúrbios genéticos são caracterizados pela diminuição parcial ou ausência total da produção de cadeias globínicas.

A hemoglobina é a molécula que carrega e transporta o oxigênio por todo o corpo. A molécula normal é um tetramero formado por dois pares de cadeias globínicas ligadas a um grupo heme. O tipo de hemoglobina é determinado pela combinação das cadeias de globina (cadeias alfa, beta, gama e delta) (Hilliard e Berkow, 1996). O defeito nos genes ligados à produção de cadeias α -globínicas resulta na α -talassemia e o defeito nos genes para cadeia β , nas β -talassemias (Oliveira e Neto, 2004) essas são as mais comumente encontradas e que apresentam relevância clínica.

A sobrecarga de ferro é implicada em vários prejuízos funcionais em humanos (Crawford, 1995; Stohs and Bagchi, 1995) e em modelos animais (Lucesoli *et al*, 1999; Brewer *et al*, 2014) embora as vias de sinalização envolvidas não sejam completamente entendidas. Entretanto, estudos sugeriram que a relação entre o acúmulo de ferro e o processo de oxidação celular pode fazer parte do mecanismo que origina as alterações patológicas provocadas pelo acúmulo de ferro nos tecidos (Lucesoli and Fraga, 1995; Lucesoli *et al*, 1999). Nossos resultados estão de acordo com achados anteriores que mostraram um aumento no MDA sérico em ratos tratados com sobrecarga aguda de ferro. Semelhante desequilíbrio no *status* antioxidante também foi observado em pacientes com beta-talassemia maior (Hershko, 2010; Waseem *et al*, 2011).

O eixo HPG é o principal modulador da função reprodutiva em mamíferos. Em fêmeas, os neurônios de liberação dos hormônios hipotalâmico gonadotrópicos (GnRH) desempenham um papel central na regulação da cascata de eventos hormonais necessários à maturação ovariana, produção de estrógenos e função reprodutiva normal (Shupnik, 1996; Herbison, 1998; Couse *et al*, 2000). Estudos prévios relataram que a sobrecarga de ferro desempenha um papel direto no desenvolvimento da toxicologia e do funcionamento impróprio dos órgãos reprodutivos em ambos os gêneros (Danesi *et al*, 1994; Skordis *et al*, 1998; Vizziello *et al*, 2004; Safarinejad, 2010;

Singer *et al*, 2011; Roussou *et al*, 2013). Em pacientes do sexo feminino com beta-talassemia maior, anormalidades endócrinas foram observadas devido à deposição de ferro no eixo HPG após transfusão sanguínea (Oerter *et al*, 1993; Ansari *et al*, 2006). Nossos resultados estão de acordo com achados prévios mostrando que o acúmulo de ferro no eixo HPG de ratas tratadas com sobrecarga de ferro. Também, diversos estudos registram que a deposição de ferro desempenha um papel crítico no prejuízo da capacidade reprodutiva através de um desequilíbrio entre efeitos prooxidantes e antioxidantes (Lucesoli *et al*, 1999; Doreswaymy and Muralidhara, 2005; Roussou *et al*, 2013). Em consonância com esses dados, a geração de estresse oxidativo foi observado em nosso estudo na hipófise de ratas do grupo Fe 1000. Todavia, Meyer *et al*, (1990) observaram que mulheres com beta-talassemia maior apresentam disfunção reprodutiva por inadequada responsividade hipofisária ao GnRH, apesar de, vários pacientes com sobrecarga de ferro hipofisária de moderada a severa terem mantido volume e função glandular normais (Noetzli *et al* 2012). Em nosso modelo observamos aumento do peso hipofisário em ratas Fe 500 e Fe 1000 e nenhuma alteração no peso do hipotálamo, níveis de gonadotropinas e peso de ovário e útero. Assim pode-se sugerir que uma importante deposição de ferro presente no eixo hipotalâmico-hipofisário resulta da exposição a sobrecarga de ferro conforme registrado neste estudo para todos os animais tratados com ferro.

Uma avaliação do acúmulo de ferro foi realizada para determinar o *status* do depósito ovariano de ferro em todas as ratas tratadas. Semelhante aos achados de Iancu (1982) e Costin *et al*, (1979), nós observamos que a sobrecarga exógena de ferro administrada foi capaz de aumentar o acúmulo ovariano conforme observado na avaliação histológica e bioquímica. Em outro estudo Lucesoli *et al*, (1999) observaram o acúmulo de altos níveis de ferro em ratos machos usando sobrecarga aguda semelhante a que realizamos. Portanto, pode-se sugerir que um acúmulo significativo de ferro no ovário é resultante da exposição a sobrecarga a partir de uma fonte exógena.

Estudos anteriores executados com modelos de sobrecarga de ferro demonstraram que a deposição de ferro induz graus diversos de disfunção do eixo HPG em mamíferos (Bergeon *et al*, 1978; Raiola *et al*, 2003; Safarinejad, 2008). Safarinejad (2010) registraram menores níveis séricos basais e pré-

ovulatórios de LH e FSH, assim como de estrógenos em pacientes com beta-talassemia maior. Interessantemente, o mesmo estudo mostrou desenvolvimento folicular anormal após o teste hMG e prejuízo na indução do processo de ovulação (Safarinejad 2010). Nossos resultados são consistentes com achados passados mostrando prejuízo no desenvolvimento folicular como a presença de folículos císticos e reduzidos folículos pré-antral, antral e CL, e aumento de folículos atresícos, indicando um desequilíbrio entre hormônios sexuais nesse modelo. Ainda, Singer *et al*, (2011) observaram que a reserva de folículos ovarianos é preservada em pacientes de 30-35 anos de idade com talassemia, apesar de reduzido volume de folículos ovarianos.

Estudos toxicológicos mostraram que ratas expostas a diferentes xenobióticos exibiram uma sinalização hormonal drasticamente alterada (Grote *et al*, 2009; Podratz *et al*, 2012). Em adição Safarinejad (2010) observaram uma redução na concentração de estrógenos basais e pré-ovulatórios em pacientes com beta-talassemia maior. Nossos achados corroboram estudos prévios mostrando uma redução nos níveis séricos de estrógenos nas ratas tratadas com ferro. Diversos estudos mostraram que a possível disfunção ovariana e acúmulo de ferro em mulheres talassêmicas resulta em vários graus de prejuízo a células da granulosa, assim como produção anormal de estrógenos ou envelhecimento dos ovários (Appasamy *et al*, 2008; Asano, 2012).

Uma das características chave da disfunção ovariana e insuficiência prematura é que ambos têm sido associados com um aumento das EROs e decréscimo dos mecanismos de defesa antioxidantes como catalisadores do envelhecimento folicular (Tatin, 1996). Em nosso estudo as ratas tratadas com ferro tiveram um aumento na produção de EROs no ovário, demonstrando o funcionamento impróprio da fisiologia do ovário, bem como alteração da arquitetura morfológica. Reubinoff *et al*, (1996) relataram que os íons de ferro mediam a produção de radicais livres nos folículos ovarianos, levando a lesão ovariana em mulheres com beta-talassemia maior. Em outro estudo Luck *et al*, (1995) e Devidé *et al*, (2012) sugeriram que a capacidade antioxidante apresenta o papel crítico para o desenvolvimento normal dos folículos ovarianos, como também do ovócito e do embrião. Al-Gubory *et al*, (2012) observaram que a produção de EROs foi capaz de induzir morte celular

apoptótica, processo semelhante presente na regressão CL que ocorre ao final do ciclo não fértil. Além disso, a sobrecarga aguda de ferro leva à disfunção da esteroidogênese ovariana e o desenvolvimento folicular ovariano anormal, pode ser atribuído ao desequilíbrio entre as vias pró-oxidantes e antioxidantes.

Uma avaliação do acúmulo de ferro foi executada para determinar o *status* do depósito uterino de ferro em todas as ratas. Semelhante aos achados de Defrere *et al*, (2010), que o ferro exógeno administrado às ratas foi capaz de aumentar o acúmulo dos níveis de ferro uterino. Estudos sugeriram que o acúmulo de ferro uterino foi associado com endometriose e desenvolvimentos de outras anormalidades uterinas (van Langendonck *et al*, 2002; Rossou *et al*, 2012). Contudo, não foram observadas alterações na morfometria do útero em nosso modelo. Em adição, os efeitos da sobrecarga de ferro no trato reprodutivo são controversos (Agarwal *et al*, 2008).

É conhecido que o estrogênio desempenha um papel na regulação na função normal do trato reprodutivo, principalmente por ERs nucleares (ER α and ER β) (Couse *et al*, 1997). Os principais efeitos estrogênicos no útero e ovário são mediados por ER α e ER β , respectivamente (Couse *et al*, 1997; Schönfelder *et al*, 2004; Murata *et al*, 2014). Em nosso modelo, os animais tratados com Fe e do grupo controle expressaram níveis similares de ER α and ER β nos tecidos ovarianos e uterinos, apesar da redução nos níveis de estrógenos nos tratados.

Além dos prejuízos endócrinos descritos acima, também buscamos avaliar a função cardiovascular nessa situação de sobrecarga aguda. Essa abordagem não só é justificada pela relação forte entre sobrecargas crônicas de ferro e acometimento cardíaco, mas também pela relação entre os hormônios femininos e o sistema cardiovascular. Consideramos esse assunto de extrema relevância, visto que os hormônios sexuais femininos, particularmente o estrogênio, exercem ação não só sobre a reprodução e desenvolvimento sexual, mas também possuem efeitos hemodinâmicos, metabólicos e vasculares, cada vez mais correlacionados à proteção cardiovascular (Tostes *et al* 2003). De fato, estudos experimentais com prejuízo na função hormonal feminina têm identificado efeitos danosos sobre a função cardíaca e vascular. São descritos não só alterações da contratilidade miocárdica (Paigel *et al* 2011, Gilberti *et al* 2007), mas também nas funções do músculo liso e do endotélio, incluindo redução da disponibilidade de NO e

aumento do estresse oxidativo vascular (Wassmann *et al* 2001; Barbacanne *et al* 1999; Dantas *et al* 2002). Como descrito por vários estudos, o comprometimento cardíaco decorrente da sobrecarga de ferro, per se, desencadeia uma disfunção diastólica, arritmia, isquemia cardíaca, lesão de perfusão, neurodegeneração e aterosclerose (Lou *et al*, 2009; Oudit *et al*, 2004; Cheng *et al*, 2013). Segundo Kramer *et al* (2012), há uma redução no trabalho de pressão-volume cardíaco após exposição à sobrecarga de ferro, além da perda da função contrátil, redução do débito cardíaco, pois a pressão sistólica é deprimida e há aumento significativo na pressão diastólica final do VE.

Corroborando com nossos dados Lou *et al* (2009) e Oudit *et al* (2004) utilizando modelos crônicos, a sobrecarga aguda utilizada em nosso protocolo levou a geração de EROs, causando a peroxidação dos lipídica e dano oxidativo. Apesar disso, não identificamos impactos significativos sobre a função arterial e ventricular nos animais anestesiados, exceção ao grupo Fe 500 que apresentou um aumento na pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD). Hahalis *et al* (2002), aborda que pacientes com beta-talassemia e sobrecarga crônica de ferro apresentam padrão hemodinâmico de disfunção diastólica do ventrículo direito, o que está relacionado ao grande índice de mortalidade desses pacientes. Alpendurada *et al* (2010), descreve que o declínio da fração de ejeção do VD se correlaciona com a diminuição da função VE, decorrente do acúmulo de ferro cardíaco. Apesar dos estudos que apresentaram tal alteração hemodinâmica seja decorrente de uma sobrecarga crônica de ferro, nossos dados dão indício que ou a sobrecarga aguda não foi suficientemente prejudicial aos mecanismos de desempenho cardíaco, ou que tais danos só seriam detectados a longo prazo, tal como relatam Muhlestein *et al* (2000), Oudit *et al* (2006) e Murph *et al* (2010).

Em conclusão, a exposição à sobrecarga de ferro pode perturbar os parâmetros reprodutivos e resultar no prejuízo da função reprodutiva normal. Nosso estudo adiciona elucidação a esses processos por caracterizar as alterações no eixo HPG e os desequilíbrios entre vias pró-oxidantes e antioxidantes pela exposição e acúmulo do ferro no eixo HPG. Este trabalho visa ao entendimento da sinalização tóxica a partir da sobrecarga de ferro no trato reprodutivo de mamíferos e aponta para os riscos a saúde, do acúmulo de ferro no desenvolvimento das anormalidades reprodutivas em mamíferos.

REFERÊNCIA

- Agarwal A., Gupta S., Sekhon L., and Shah R. "Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 10, no. 8, pp. 1375–1403, 2008.
- Al-Gubory KH, Garrel C, Faure P, and Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reproductive Biomedicine Online*, vol. 25, no. 6, pp. 551–560, 2012.
- Alpendurada F, Carpenter JP, Deac M, Kirk P, Walker JM, Porter JB, et al. Relation of myocardial T2* to right ventricular function in thalassaemia major. *Eur Heart J*. Apr 22, 2010.
- Andrews NC. Iron metabolism: Iron Deficiency and Iron Overload *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 01:p 75–98, 2000.
- Ansari S, Azarkeivan A, and Tabaroki A. Pregnancy in patients treated for beta thalassemia major in two centers (Ali Asghar Children's Hospital and Thalassemia Clinic): outcome for mothers and newborn infants. *Pediatric Hematology- Oncology*, vol. 23, no. 1, pp. 33–37, 2006.
- Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani A, Groome N. P., and Muttukrishna S, Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertility and Sterility*, vol. 89, no. 4, pp. 912–921, 2008.
- Asano Y. Age-related accumulation of non-heme ferric and ferrous iron in mouse ovarian stroma visualized by sensitive non-heme iron histochemistry, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 60, no. 3, 229–242, 2012.
- Bartfay WJ & Bartfay E. Iron-overload cardiomyopathy: evidence for a free radical--mediated mechanism of injury and dysfunction in a murine model. *Biol Res Nurs* 2, p 49-59, 2000.
- Bergeon, C., Kovacs, K. 1978. Pituitary siderosis: a histologic, immunocytologic, and ultrastructural study. *Am J Pathol.* 9,295–309, 1978.
- Bianchi, F. J., Tanno, A. P., and Marcondes, F. K. Relação entre nível de estresse e supersensibilidade à norepinefrina em ratas no proestro. *Braz. J. Pharm. Sci.* 37, 391–98, 2001.
- Borgeest, C., Symonds, D., Mayer, L. P., Hoyer, P. B., and Flaws, J. A. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol. Sci.* 68, 473–78, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 853. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2011/prt0853_05_12_2011.html>. Acesso: 19/05/2015. 2011. Ref Type: Generic

Brewer C, Otto-Duessel M, Wood RI, And Wood JC. Sex differences and steroid modulation of cardiac iron in a mouse model of iron overload. *Translational Research*. vol 163, n 2, 2013.

Cançado RD. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. *Rev. bras. hematol. hemoter.*; Vol 29, n 3, p 316-326, 2010.

Cheng CF & Lian WS. Prooxidant mechanisms in iron overload cardiomyopathy. *Biomed Res Int* 2013, 740573, 2013.

Costin G, Kogut MD, Hyman CB, Ortega JA. Endocrine abnormalities in thalassemia major. *Am J Dis Child*. 133:p 497-502, 1979.

Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. 138, p 4613–21, 1997

Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Vol 74, n 5, p 287-96, 2000.

Crawford, R. D. Proposed role for a combination of citric acid and ascorbic acid in the production of dietary iron overload: a fundamental cause of disease. *Biochem. Mol. Med*. 54, 1–11, 1995.

Danesi L, Scacchi M, Miragoli AM et al.. Induction of follicle maturation and ovulation by gonadotropin administration in women with β -thalassemia. *European Journal of Endocrinology*, vol. 131, no. 6, pp. 602–606, 1994.

Darshan D & Anderson GJ. Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals*. 22, p 77-87, 2009.

Day SM, Duquaine D, Mundada LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S, & Fay WP. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation*. 107, 2601-2606, 2009.

Defrere S., Gonzalez-Ramos R., Lousse JC et al., Insights into iron and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) involvement in chronic inflammatory processes in peritoneal endometriosis. *Histology and Histopathology*, vol. 26, no. 8, pp. 1083–1092, 2011.

Devine PJ, Perreault SD, and Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biology of Reproduction*, vol. 86, n. 2, article 27, 2012.

Doreswamy K, Muralidhara. Genotoxic consequences associated with oxidative damage in testis of mice subjected to iron intoxication. *Toxicology*. vol 206, n 1, p169-78, 2005.

Dornelles PR, Lailson-Brito J, Fernandez MA, Vidal LG, Barbosa LA, Azevedo AF, et al. Evaluation of cetacean exposure to organotin compounds in Brazilian waters through hepatic total tin concentrations. *Environ Pollut*. 156(3):1268-76, 2008.

Dunn LL, Suryo RY, & Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 17, 93-100, 2007.

Edison ES, Bajel A, Chandy M. Iron homeostasis: new players, newer insights. *Eur J Haematol*. 81, p 411-424, 2008.

Edwards CQ, Kelly TM, Ellwein G, & Kushner JP. Thyroid disease in hemochromatosis. Increased incidence in homozygous men. *Arch Intern Med*. vol 143, p 1890-189, 1983.

Filicori M, Flamigni C, Vizziello G, Dalpiaz C, Ferrari P, Flaminia R, Santoro N, Crowley WF Jr. Hypothalamic control of gonadotropin secretion in the human menstrual cycle. *Prog Clin Biol Res*. 225, 55-74, 1986.

Freeman, M. E. The ovarian cycle of the rat. In *Physiology of reproduction*, ed.E. Knobil and J. Neil, 1893–928, 1988. New York, NY: Raven Press.

Gaenger H, Marschang P, Sturm W, Neumayr G, Vogel W, Patsch J, & Weiss G. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. *J Am Coll Cardiol*. 40, 2189-2194, 2002.

Galleano, M., Puntarulo, S. Mild iron overload effect on rat liver nuclei. *Toxicology*. 93, 125-34, 1994.

Ganz T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev* 93: 1721–1741, 2013.

Gattermann N. The treatment of secondary hemochromatosis. *Dtsch Arztebl Int* 106, 499-504, 2009.

Gao Y, Wang N, Zhang Y, Maa Z, Guan P, Maa J, Zhang Y, Zhang X, Wang J, Zhang J, Chu L. Mechanism of protective effects of Danshen against iron overload-induced injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 145, 254–260, 2013.

Gracelli, J.B., Souza-Menezes, J., Barbosa, C.M., Ornellas, F.S., Takiya, C.M., Alves, L.M., Wengert, M., Feltran, S., Gda, Caruso-Neves, C., Moyses, M.R., Prota, L.F., Morales, M.M. Role of estrogen and progesterone in the modulation of CNG-A1 and Na/K+-ATPase expression in the renal cortex. *Cell Physiol. Biochem.* 30,160–172, 2012.

Grote K, Hobler C, Andrade AJ, Grande SW, Gericke C, Talsness CE, et al. Sex differences in effects on sexual development in rat offspring after pre- and postnatal exposure to triphenyltin chloride. *Toxicology.* 260:53–9, 2009.

Grotto HZW. Fisiologia e metabolismo do ferro. *Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia* 32, 8-17. 2010. Ref Type: Generic

Guan S., Ma J., Zhang Y, Gao Y, Zhang Y, Zhang X, Wang N, Xie Y, Wang J, Zhang J, Chu L. Danshen (*Salvia miltiorrhiza*). Injection Suppresses Kidney Injury Induced by Iron Overload in Mice. *Plos one*, 2013.

Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C, & Rochette L. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res* 58, 1721-1738, 2014.

Hahalis G, Manolis AS, Apostolopoulos D, Alexopoulos D, Vagenakis AG, Zoumbos NC. Right ventricular cardiomyopathy in beta-thalassaemia major. *Eur Heart J.* 23:147-56, 2002.

Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302–330. Woolley CS (2007) Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:657– 680, 1998.

Hershko C. Pathogenesis and management of iron toxicity in thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1202, pp. 1–9, 2010.

Hramiak IM, Finegood DT, & Adams PC. Factors affecting glucose tolerance in hereditary hemochromatosis. *Clin Invest Med* 20, 110-118, 1997.

Iancu T. Iron overload. *Molec. Aspects Med.* Vol. 6, pp1 to 100, 1982.

Jiang H, Song N, Wang J, Ren LY, & Xie JX. Peripheral iron dextran induced degeneration of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Neurochem Int* 51, 32-36, 2007.

Kramer JH, Spurney CF, Iantorno M, et al. d-Propranolol protects against oxidative stress and progressive cardiac dysfunction in iron overloaded rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* Vol. 90, 2012.

Kukongviriyapan V, Somparn N, Senggunprai L, Prawan A, Kukongviriyapan U, & Jetsrisuparb A. Endothelial dysfunction and oxidant status in pediatric

patients with hemoglobin E-beta thalassemia. *Pediatr Cardiol.* 29, 130-135, 2008.

Latunde-Dada GO, McKie AT, Simpson RJ. Animal models with enhanced erythropoiesis and iron absorption. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1762, 414–423, 2006.

Lucesoli, F., Fraga, C. G. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and alpha-tocopherol supplementation. *Toxicology.* 132, 179-86, 1995.

Lucesoli F, Caligiuri M, Roberti MF, et al. Dose-Dependent Increase of Oxidative Damage in the Testes of Rats Subjected to Acute Iron Overload. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* vol. 372, n. 1, p. 37–43, 1999.

Luck MR, Jeyaseelan I, Scholes RA. Ascorbic acid and fertility. *Biol Reprod.* 52(2):262-266, 1995.

Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, & Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13612-13617, 2006.

Lou LX, Geng B, Chen Y, Yu F, Zhao J, & Tang CS. Endoplasmic reticulum stress involved in heart and liver injury in iron-loaded rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36, 612-618, 2009.

Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, RJ. Protein measurement with the folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275. 1951.

Ma Z, Zhou Y, & Xie J. Nifedipine prevents iron accumulation and reverses iron-overload-induced dopamine neuron degeneration in the substantia nigra of rats. *Neurotox Res* 22, 274-279, 2012.

Magiakou MA, Mastorakos G, Webster E, Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. *Ann N Y Acad Sci.* 816, 42-56, 1997.

Marcondes FK. Determination of the estrous cycle phases of Rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.,* 62(4A): 609-614, 2002.

Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, Le Gall JY, Brissot P, David V, & Deugnier Y. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology.* 117, 1155-1163, 1999.

Mendoza-Rodríguez, C.A., García-Guzmán, M., Baranda-Avila, N., Morimoto, S., Perrot-Appanat, M., Cerbón, M. Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reprod Toxicol.* 31, 177-83, 2011.

Meyer WR, Hutchinson-Williams KA, Jones EE, and Decherney AH. Secondary hypogonadism in hemochromatosis. *Fertility and Sterility*, vol. 54, no. 4, pp. 740–742, 1990.

Moon SN, Han JW, Hwang HS, Kim MJ, Lee SJ, Lee JY, Oh CK, & Jeong DC. Establishment of secondary iron overloaded mouse model: evaluation of cardiac function and analysis according to iron concentration. *Pediatr Cardiol* 32, 947-952, 2011.

Muhlestein JB. Cardiac abnormalities in hemochromatosis. In: Barton JC, Edwards CQ, editors. *Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis, and treatment*. Cambridge: Cambridge University Press. 297-310, 2000.

Murata T, Narita K, Ichimaru T. Rat uterine oxytocin receptor and estrogen receptor α and β mRNA levels are regulated by estrogen through multiple estrogen receptors. *J Reprod.* 60(1):55–61, 2014.

Murphy CJ & Oudit GY. Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Card Fail* 16, 888-900, 2010.

Musumeci M, Maccari S, Massimi A, Stati T, Sestili P, Corritore E, Pastorelli A, Stacchini P, Marano G, Catalano L. Iron excretion in iron dextran-overloaded mice. *Blood Transfus.* 12: 485-90, 2014.

Noetzli, L. J., A. Panigrahy, A, Mittelman, S. D. et al., Pituitary iron and volume predict hypogonadism in transfusional iron overload. *American Journal of Hematology*, vol. 87, no. 2, pp. 167–171, 2012.

Oerter KE, Kamp GA, Munson PJ, Nienhuis AW, Cassorla FG, Manasco PK,. Multiple hormone deficiencies in children with hemochromatosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* vol. 76, no. 2, pp. 357–361, 1993.

Okonko DO, Mandal AK, Missouriis CG, Poole-Wilson PA. Disordered iron homeostasis in chronic heart failure: prevalence, predictors, and relation to anemia, exercise capacity, and survival. *J Am Coll Cardiol.* 58(12):1241-51, 2011.

Oliveira F, Rocha S, and Fernandes R. Iron Metabolism: From Health to Disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 00: 1–9, 2014.

Oudit GY, Sun H, Trivieri MG, Koch SE, Dawood F, Ackerley C, Yazdanpanah M, Wilson GJ, Schwartz A, Liu PP, & Backx PH. L-type Ca^{2+} channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat Med* 9, 1187-1194, 2003.

Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, et al. Taurine Supplementation Reduces Oxidative Stress and Improves Cardiovascular Function in an Iron-Overload Murine Model. *Circulation*. 2004;109:1877-1885; originally published online March 22, 2004.

Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, Liu PP, Backx PH. Role of L-type Ca^{2+} channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. *J Mol Med*. vol 84, pp. 349-64. 2006.

Pardo Andreu GL, Inada NM, Vercesi AE, & Curti C. Uncoupling and oxidative stress in liver mitochondria isolated from rats with acute iron overload. *Arch Toxicol* 83, 47-53, 2009.

Podratz PL, Delgado Filho VS, Lopes PF, Sena GC, Matsumoto ST, Samoto VY, et al. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. *J Toxicol Environ Health A*. 75:1035-46, 2012.

Ponka P, Beaumont C, & Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 35, 35-54, 1998.

Raiola G, Galati MC, De Sanctis V, et al. Growth and puberty in thalassemia major. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2: 259–266, 2003.

Reubinoff BE, Har-El R, Kitrossky N, et al. Increased levels of redox-active iron in follicular fluid: a possible cause of free radical-mediated infertility in beta-thalassemia major. *Am J Obstet Gynecol*. 174(3):914-918, 1996.

Roussou, P., Tsagarakis, N.J., Kountouras, D., Livadas, S., Diamanti-Kandarakis, E. 2013. Beta-Thalassemia Major and Female Fertility: The Role of Iron and Iron-Induced Oxidative Stress. Hindawi Publishing Corporation Anemia. 2013, 617204.

Safarinejad MR. Evaluation of semen quality, endocrine profile and hypothalamus-pituitary-testis axis in male patients with homozygous beta-thalassemia major. *J Urol*. 179:2327–2332, 2008.

Safarinejad MR. Reproductive hormones and hypothalamic-pituitary-ovarian axis in female patients with homozygous β -thalassemia major. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. vol. 32, no. 4, pp. 259–266, 2010.

Santos PC, Dinardo CL, Cancado RD, Schettert IT, Krieger JE, & Pereira AC. Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 34, 311-316, 2012a.

Santos PC, Krieger JE, & Pereira AC. Molecular diagnostic and pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Int J Mol Sci*. 13, 1497-1511, 2012b.

Shazia, Q. Q., Mohammad, Z.H., Rahman, T., Shekhar, H.U. Correlation of Oxidative Stress with Serum Trace Element Levels and Antioxidant Enzyme Status in Beta Thalassemia Major Patients: A Review of the Literature. *Hindawi Publishing Corporation Anemia*. 2012, 7.

Schwartz, N. B. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. *Am. J. Physiol*. 107:1251–59, 1964.

Schönfelder G, Friedrich K, Paul M, Chahoud I. Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia*. 6:584-94, 2004.

Shupnik MA. Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin genes, *Trends Endocrinol. Metab*. 7, 272–276, 1996.

Siddique A, Kowdley KV. Review article: the iron overload syndromes. *Aliment Pharmacol Ther*. 35: 876–893, 2012.

Siminoski K, D'Costa M, & Walfish PG. Hypogonadotropic hypogonadism in idiopathic hemochromatosis: evidence for combined hypothalamic and pituitary involvement. *J Endocrinol Invest* 13, 849-853, 1990.

Singer ST, Vichinsky EP, Gildengorin G, van Disseldorp J, Rosen M, and Cedars MI. Reproductive capacity in iron overloaded women with thalassemia major. *Blood*, vol. 118, no. 10, pp. 2878–2881, 2011.

Skordis N, Christou S, Koliou M, Pavlides N, and Angastiniotis M, Fertility in female patients with thalassemia. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, vol. 11, supplement 3, pp. 935–943, 1998.

Skordis N, Gourni M, Kanaris C, Toumba M, Kleanthous M, Karatzia N, Pavlides N, Angastiniotis M. The impact of iron overload and genotype on gonadal function in women with thalassaemia major. *Pediatr Endocrinol Rev. Suppl* 2:292-5, 2004.

Spornitz, U. M., Socin, C. D., and Dravid, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat. Rec*. 254: 116–26, 1999.

Stohs, S. J., Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-36, 1995.

Talsness, C. E., Shakibaei, M., Kuriyama, S. N., Grande, S. W., Sterner-Kock, A., Schnitker, P., de Souza, C., Grote, K., Chaboud, I. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicol Lett.* 157, 189–202, 2005.

Tarin JJ. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod.* 2(10):717-724, 1996.

van Langendonckt A., Casanas-Roux F, Donnez, J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertility and Sterility*, vol. 77, no. 5, pp. 861–870, 2002.

Vizziello G, Carone D, Caroppo E, Vitti A, Pasquadibisceglie A, and D'amato G. Ovulation induction with gonadotropin in patients with thalassemia pretreated with pulsatile. GnRH: outcome, *Minerva Ginecologica*, vol. 56, no. 5, pp. 485–487, 2004.

Waseem F, Khemomal KA, and Sajid R, Antioxidant status in beta thalassemiamajor: a single-center study. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, vol. 54, no. 4, pp. 761–763, 2011.

Wiggers, G. a, Peçanha, F.M., Briones, a M., Pérez-Girón, J. V, Miguel, M., Vassallo, D. V, Cachofeiro, V., Alonso, M.J., Salaices, M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295, 2008. H1033–H1043